ÜBER DAS AUFTRETEN EXTRAZELLULÄRER ORGANISCHER SUBSTANZ IN SYNCHRONKULTUREN DER GRÜNALGE SCENEDESMUS ACUTUS

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Ruhr - Universität Bochum

vorgelegt von

Alfred Bolze

aus Hitzacker

1976

ÜBER DAS AUFTRETEN EXTRAZELLULÄRER ORGANISCHER SUBSTANZ IN SYNCHRONKULTUREN DER GRÜNALGE SCENEDESMUS ACUTUS

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Ruhr - Universität Bochum

vorgelegt von

Alfred Bolze

aus Hitzacker

1976

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Referent: Prof. Dr. C. J. Soeder
Korreferent: Privatdozent Dr. E. F. Elstner

Die Dissertation wurde am 27. 1. 1976 bei der Ruhr - Universität Bochum eingereicht und durch die Naturwissenschaftliche Fakultät am 10. 3. 1976 angenommen.
Tag der mündlichen Prüfung: 25. 3. 1976.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	5
2.	Material und Methoden	8
2.1.	Algenstämme	8
2.2.	Anzucht	8
2.2.1.	Kultureinheiten	8
2.2.1.1.	Röhrenkulturen	8
2.2.1.2.	Kultur in Kippschwingungsgefäßen	9
2.2.1.3.	Freilandkulturen	10
2.2.2.	Nährlösung	10
2.2.3.	Synchronisation	12
2.2.4.	Sterilität	12
2.3.	Analytische Bestimmungen	13
2.3.1.	Extrazelluläre gelöste organische Substanz	13
2.3.1.1.	Definition	13
2.3.1.2.	Bestimmung	14
2.3.2.	Bestimmung der Wachstumparameter	17
2.3.2.1.	Zellzahl	17
2.3.2.2.	Trockensubstanz	17
2.3.2.3.	Optische Dichte	17
2.3.2.4.	Chlorophyll	19
2.3.2.5.	Gesamtstickstoff und Rohprotein	20
2.3.2.6.	Kohlenhydrat	20
2.3.2.7.	Glykolsäure	21
2.3.2.8.	Aschegehalt	21
2.3.3.	Auswertung	21
3.	Ergebnisse	23
3.1.	Wachstumsverlauf der Algen im LDW	23

		Seite
3.1.1.	Wachstum und Entwicklung in Röhrenkulturen	23
3.1.2.	Wachstum und Entwicklung in Kippschwingungsgefäßen	25
3.1.3.	Abhängigkeit der Wachstumsleistung von der Suspensionsdichte	27
3.2.	Konzentrationsänderungen der extrazellulären gelösten organischen Substanz	29
3.2.1.	Laborkulturen im LDW	29
3.2.2.	Versuche zur chemischen Analyse der gel. O. S.	33
3.2.3.	Freilandkulturen unter natürlichen Bedingungen	35
3.3.	Akkumulation gelöster organischer Substanz in Abhängigkeit von physikalischen Faktoren und von der CO_2-Versorgung	36
3.3.1.	Licht	37
3.3.1.1.	Lichtintensität	37
3.3.1.2.	Lichtregime	40
3.3.2.	Ausgangsdichte	42
3.3.3.	Temperatur	44
3.3.3.1.	Suboptimale Temperatur	44
3.3.3.2.	Überoptimale Temperaturen	44
3.3.4.	CO_2-Versorgung	45
3.3.4.1.	Einfluß unterschiedlicher CO_2-Eintragsraten auf Wachstum und Akkumulation gelöster O. S.	46
3.3.4.2.	Einfluß unterschiedlicher CO_2-Eintragsraten auf die Akkumulation gelöster O. S. im Zusammenhang mit der Zellentwicklung	49
3.3.4.3.	Einfluß der Begasungsrate auf die chemische Zusammensetzung der gel. O. S.	52
3.3.5.	Kombination reduzierter CO_2-Begasung und Lichtintensität	54
3.4.	Die Akkumulation gelöster O. S. in Abhängigkeit vom Mineralstoffangebot	57

		Seite
3.4.1.	Mangan	57
3.4.2.	Magnesium, Calcium	58
3.4.3.	Sulfat	61
3.4.3.1.	Einfluß der SO_4^{--}-Konzentration auf O.D.-Zunahme und Akkumulation gelöster O. S.	61
3.4.3.2.	Einfluß des Sulfatmangels auf die Akkumulation gelöster O. S. im Zusammenhang mit der Zellentwicklung	64
3.4.3.3.	Produktionskinetik einiger Biomassekomponenten in Sulfatmangel-Kulturen	67
3.4.3.4.	Einfluß des Sulfatmangels auf die chemische Zusammensetzung der gel. O. S.	70
3.4.4.	Phosphat	72
3.4.5.	Nitrat, Harnstoff	76
3.4.6.	Überoptimale Nährstoffkonzentrationen	77
4.	Diskussion	82
4.1.	Methoden-Kritik	82
4.1.1.	Abtrennung der Algen von der Nährlösung	82
4.1.2.	Adaptation der Kulturen	82
4.1.3.	Abzug der Blindwerte bei der Bestimmung der gesamten gel. O. S.	83
4.2.	Menge und Art der Akkumulate	84
4.3.	Frage der Entwicklungsabhängigkeit der Akkumulatbildung	86
4.4.	Wirkung geänderter Kulturbedingungen auf die Akkumulation gelöster O. S.	88
4.5.	Anwendung der Ergebnisse auf die Mikroalgenmassenkultur	95
5.	Zusammenfassung	97
6.	Literaturverzeichnis	99

Abkürzungen

AFS	Autosporenfreisetzung
AMZ	Autosporenmutterzellen
DL	Dauerlicht
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat
$f_{O.D.}$	Vermehrungsfaktor der Optischen Dichte (s. S. 18)
f_{TS}	Vermehrungsfaktor der Trockensubstanz (s. S. 18)
gel. O. S.	extrazelluläre gelöste organische Substanz
LDW	Licht-Dunkelwechsel
Nl	Normal-Liter bei 20°C und 760 mm Quecksilbersäule
$[NO_3]_O$	Nitratkonzentration im Medium bei Lichtbeginn
O. D.	Optische Dichte bei 560 nm
$O. D._O$	Optische Dichte zu Beginn des LDW, Ausgangsdichte
$O. D._{24}$	Optische Dichte zur 24. Std. nach Lichtbeginn
$[PO_4^{3-}]_O$	Phosphatkonzentration im Medium bei Lichtbeginn
$[SO_4^{2-}]_O$	Sulfatkonzentration im Medium bei Lichtbeginn
Std. n. L.	Stunden nach Lichtbeginn
TS	Trockensubstanz
TS_O	Trockensubstanz zu Beginn des LDW
TS_{24}	Trockensubstanz zur 24. Std. nach Lichtbeginn
VF	Vermehrungsfaktor (s. S. 18)
x); 1); 2)	Fußnote

1. Einleitung

Über das Auftreten extrazellulärer Stoffwechselprodukte von Algen unter natürlichen und Laborbedingungen liegt eine Fülle von Befunden vor (FOGG 1971; HELLEBUST 1974). Wo immer sich algenbürtige Stoffe unter unsterilen Bedingungen im Medium anreichern (organische Säuren, Kohlenhydrate, Peptide u. dgl.), können sie als Substrat für heterotrophe Mikroorganismen dienen. So wird denn auch in den Gewässern eine enge Korrelation zwischen den Populationsdichten der Planktonalgen einerseits und der planktischen Bakterien andererseits beschrieben (z. B. OVERBECK 1972; WRIGHT 1975). Auch in anderer Hinsicht sind extrazelluläre Algenstoffe von ökologischer Bedeutung, indem sie vielfach das Wachstum von Mikroorganismen teils stimulierend teils inhibierend zu beeinflussen vermögen (HUNTSMAN & BARBER 1975; vgl. auch die Sammelreferate von FOGG 1962, FOGG 1971, LEFEVRE 1966 und SAUNDERS 1957).

Im Vordergrund weitaus der meisten Untersuchungen steht die Frage nach der Art und Menge bestimmter extrazellulärer Algenprodukte (z. B. WALSBY, 1974) sowie nach der Regulation ihrer Synthese und/oder Ausscheidung (z. B. KOWALLIK & SCHMID 1971, für Glykolsäure). Verhältnismäßig wenige Arbeiten sind der Bestimmung der Gesamtakkumulation bzw. -ausscheidung gelöster organischer Substanz im Medium gewidmet. Sie beschränken sich zudem großenteils auf die Ermittlung des Verhältnisses der intrazellulären zu den extrazellulären Photosyntheseprodukten mittels der ^{14}C-Methode.

Die angegebenen Werte für die extrazellulär vorliegenden organischen Substanzen liegen in Laborkulturen von Grünalgen

meist zwischen 1 und 8 % des je Zeiteinheit photosynthetisch fixierten Kohlenstoffs (NALEWAJKO 1966; HELLEBUST 1965). Bei Chlamydomonas wurden sogar bis zu 45 % der neugebildeten organischen Substanz im Medium nachgewiesen (ALLEN 1956). Auch liegen Befunde vor, nach denen bestimmte Kulturbedingungen die exkretorische Aktivität stark fördern, z. B. überoptimales Starklicht (NALEWAJKO 1966) oder Schwachlicht (WATT 1966). Dabei besteht nach NALEWAJKO eine negative Korrelation zwischen der Akkumulation organischer Substanz im Medium und der Intensität der photosynthetischen C-Fixierung: Je stärker die Photosynthese inhibiert wird, umso stärker ist der relative Verlust der Zellen an organischem Material.

Bei der Massenproduktion von Mikroalgen würde eine Akkumulation organischer Substanz im Kulturmedium einen unerwünschten Ausbeuteverlust darstellen und zudem die Vermehrung saprotropher Bakterien begünstigen. Um dies zu vermeiden, sollten die Bedingungen bekannt sein, welche die Anhäufung organischer Substanz im Medium fördern. Deshalb bestand bei Beginn der vorliegenden Arbeit ein Interesse daran festzustellen, welche Mengen an gelöster organischer Substanz in Grünalgenkulturen insgesamt vorliegen, und unter welchen Bedingungen vornehmlich mit erhöhten Verlusten organischer Substanz an das Medium gerechnet werden muß. Zur Ermittlung des Einflusses exogener Faktoren wurden Beleuchtungsintensität, Kulturdichte, Temperatur und Nährstoffversorgung variiert.

Über die Akkumulation gelöster organischer Substanz im Medium von Synchronkulturen gibt es in der Literatur kaum summarische Angaben, sondern fast ausschließlich Daten zur Konzentrationsänderung bestimmter Verbindungen (z. B. GIMMLER et al. 1969; LANG & CHRISPEELS 1975). Da uns diese Art der Kultivierung

die Möglichkeit gibt, auch die Bedeutung endogener Faktoren für das Auftreten extrazellulärer gelöster organischer Substanz zu ermitteln, wurden für die folgenden Untersuchungen größtenteils Synchronkulturen verwendet. Als Objekt diente die für Algengroßkulturen bevorzugte coccale Grünalge Scenedesmus acutus var. alternans.

2. Material und Methoden

2.1. Algenstämme

Das vorwiegend verwendete Objekt war Scenedesmus acutus var. alternans HORTOB. (= S. obliquus (TURP.) BRÉB.; Stamm 276 - 3a der Algensammlung der Universität Göttingen). Zum Vergleich dienten Coelastrum proboscideum BOHLIN (nach der Revision von SODOMKOVA 1972 = Coelastrum sphaericum NÄGELI; Stamm Freising), Spirulina platensis (NORDST.) GEITLER (= Arthrospira platensis (NORDST.) GOMONT; Stamm Compère, Brüssel) und Euglena gracilis KLEBS, Stamm Z (die drei letztgenannten aus der Algensammlung Dortmund).

2.2. Anzucht

2.2.1. Kultureinheiten

2.2.1.1. Röhrenkulturen

Die Kultivierung der Algen erfolgt größtenteils in Kulturröhren aus Jenaer Geräteglas im Lichtthermostaten. Das Kulturvolumen beträgt im allgemeinen 330 ml. Eine nähere Beschreibung der Anzuchtgefäße findet sich bei SOEDER et al. (1967).

Die Lichtintensität an der Oberfläche der Kulturröhren beträgt ca. 10 klux (6 x Osram - L, 40 W/32) bzw. 18 klux bei Verwendung von Reflex-Leuchtstoffröhren (7 x Osram - L, 40 W/22 R). Niedrigere Beleuchtungsstärken wurden entweder durch Ausschalten einzelner Leuchtstofflampen oder durch Abdecken der Lichtquellen mit weißen Tüchern erhalten.

Die Temperatur im Lichtthermostaten beträgt 30 $\pm$ 0,1°C. Für die CO_2-Zufuhr und gleichzeitige Turbulenzerzeugung sorgt ein Belüftungsgemisch mit 1 Vol. % CO_2 in Luft, das die Algensus-

pension mit einem Durchsatz von 16 Nl Gas/Std. passiert.

2.2.1.2. Kultur in Kippschwingungsgefäßen

Die von MILNER (BURLEW, ed. 1964) verwendete und von PAYER und SOEDER weiterentwickelte Vorrichtung erlaubt die Handhabung von Kulturvolumina bis zu 6 l Algensuspension. Es handelt sich um einen quaderförmigen, mit einer Deckscheibe versehenen Behälter aus Edelstahl, der durch einen Antriebsmechanismus über Exzenter in langsame Kippschwingungen (8 Schwingungen/min) versetzt wird. Durch Strömungswiderstände wird die Turbulenz erhöht. Die Höhe des Flüssigkeitspegels erreicht bei 5 l Füllmenge im Mittel 2,5 cm und gestattet eine intensive Beleuchtung größerer Algenmengen.

Die Beleuchtung erfolgt von oben durch 12 Reflex-Leuchtstoffröhren (Osram - L, 65 W/22 R). An der Oberfläche der Suspension beträgt die Lichtintensität 22 klux.

Das Becken läßt sich über einen doppelten Boden thermostatisieren. Bei Einstellung einer mittleren Temperatur von 30,7°C treten in Intervallen von ca. 5 min periodische Schwankungen von maximal $\pm$ 0,3°C auf. Die Algensuspension wird über 2 Zuleitungen, die in die Flüssigkeit eintauchen und je in einer Fritte enden, mit einem Gemisch von 8 Vol. % CO_2 in Luft begast.

Die genannten Kulturbedingungen ermöglichen vollsynchrones Wachstum von Scenedesmus 276 - 3a. Der Vorteil der Kippschwingungsgefäße gegenüber den sonst verwendeten Kulturröhren besteht darin, daß umfangreichere chemische Analysen im Laufe der Zellentwicklung einer einzigen Kultur ausgeführt werden können.

2.2.1.3. Freilandkulturen

Einige Messungen wurden an Freilandgroßkulturen verschiedener Mikroalgen angestellt, die in Horizontalgerinnen von ca. 15 m^3 Fassungsvermögen kultiviert wurden. Diese Kulturanlagen werden u. a. bei STENGEL (1970) ausführlich beschrieben.

2.2.2. Nährlösung

Als Medium diente "N_8" (nach SOEDER et al. 1971; Tab. 1) in Verbindung mit der Spurenelementlösung "PAZ" (nach PAYER & TRÜLTZSCH 1972; Tab. 2). In wenigen Fällen wurde ein Spezial-Phosphatdünger (Scenedin III) unter Zusatz von Harnstoff, Fe-EDTA und Spurenelementen als Nährlösung verwendet (Tab. 3). Vor dem Übergang vom Vollmedium in ein Mangelmedium wurden die Algen auf dem Filter mit destilliertem Wasser gewaschen.

Tabelle 1. Zusammensetzung der Nährlösung N_8.

	mg/l	Element	Mol/l
KNO_3	1000	N	$9{,}90 \times 10^{-3}$
KH_2PO_4 $Na_2HPO_4 \times 12H_2O$	503 885	P	$6{,}16 \times 10^{-3}$
$MgSO_4 \times 7H_2O$	50	S/Mg	$2{,}01 \times 10^{-4}$
$CaCl_2 \times 2H_2O$	20	Ca	$1{,}36 \times 10^{-4}$
$Fe(NO_3)_3 \times 9H_2O$	7,2	Fe	$1{,}8 \times 10^{-5}$
EDTA (Titriplex III)	6,66		
Spuren-Stammlösung PAZ x)	1ml/l		
pH-Wert	6,7		

x) s. Tabelle 2

Tabelle 2. Konzentrationen der Spurenelemente PAZ.

in 1 l Stammlösung		im Nährmedium	
Nährsalz	Konzentration in mg	Element	Endkonzentration g Atom/l
$Al_2(SO_4)_3 \times 18H_2O$	6,66	Al	2×10^{-8}
$MnCl_2 \times 4H_2O$	99,0	Mn	5×10^{-7}
$NiSO_4 \times 6H_2O$	26,3	Ni	1×10^{-7}
$CoSO_4 \times 6H_2O$	2,81	Co	1×10^{-8}
$CuSO_4 \times 5H_2O$	4,99	Cu	2×10^{-8}
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	6,32	Zn	$2{,}2 \times 10^{-8}$
KJ	249,0	J	$1{,}5 \times 10^{-6}$
KBr	238,0	Br	2×10^{-6}
LiCl	8,48	Li	2×10^{-7}
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4H_2O$	1,77	Mo	1×10^{-8}
H_3BO_3	30,9	B	5×10^{-7}
NH_4VO_3	2,92	V	$2{,}5 \times 10^{-8}$

Tabelle 3. Zusammensetzung der Nährlösung mit Scenedin III.

	mg/l Leitungswasser
Scenedin III (fein gemörsert)	100 mg
Harnstoff	175 mg
Spurenstammlösung [1]	1 ml/l
FeEDTA [2]	

1) s. Tabelle 2.

2) s. Tabelle 1.

2.2.3. Synchronisation

Nach dem Animpfen aus Schrägagarkulturen wuchsen die Algen zunächst 2 1/2 bis 3 1/2 Tage unverdünnt bis zu einer bestimmte Suspensionsdichte heran. Die Synchronisierung erfolgte durch einen Licht-Dunkelwechsel von 16 : 8 Std. Jeweils zu Lichtbeginn wurde die Suspension auf eine Standarddichte (meist $O.D._{0}$ 0,12; s. S. 17) zurückverdünnt. Wie die mikroskopische Kontroll zeigte, waren die Kulturen 2 bis 4 Tage nach dem Animpfen vollsynchron. Die Standarddichte von $O.D._{0}$ = 0,12 entspricht einem Trockengewicht von etwa 125 mg/l oder einer Zelldichte von $7,5 \times 10^{6}$ Zellen/ml $\pm$ 10 %. Bei höheren Ausgangsdichten ist keine einwandfreie Synchronisation mehr zu erzielen. Die Kippschwingungsgefäße wurden mit bereits vorsynchronisierten Algen angesetzt und bis zum Versuchsbeginn mindestens 2mal im Abstand von 24 Std. auf eine Ausgangsdichte von 0,10 verdünnt. Asynchrone Kulturen wurden durch entsprechende Anzucht im Dauerlich erhalten.

2.2.4. Sterilität

In Vorversuchen stellte sich heraus, daß Bakterienfreiheit der Kulturen Voraussetzung für eine fehlerlose Bestimmung der gel. O. S. im Medium ist, da die Kontamination der Algenkulture mit Bakterien zu einer Abnahme der Menge gelöster O. S. führt. Unter Standardbedingungen (s. S. 22) liegen die erreichten Konzentrationen in den bakterienhaltigen Suspensionen am Ende des LDW etwa 25 % unter denen der Sterilkulturen. Der Bakterien titer erreicht unter den angewendeten Bedingungen (3tägige Anzucht in unsteriler Nährlösung, anschließend 3malige Verdünnung die Größenordnung 10^{5} Bakterien/ml und liegt damit etwa zwei Zehnerpotenzen unter dem Titer der Algenzellen. Besseres Bak-

terienwachstum tritt erst ein, wenn die Kulturen unverdünnt weiterlaufen. Es fällt auf, daß sich die Bakterien in Sulfatmangelkulturen etwa doppelt so stark vermehren wie in N_8-Kulturen.

Die Kulturen wurden unter sterilen Bedingungen angezogen (Verwendung bakterienfreier Stammkulturen, 20-minütige bzw. 1-stündige Sterilisation der Nährlösung im Autoklaven bzw. Dampftopf, Wattefilter vor den Zu- und Abluftrohren, Verwendung steriler Pipetten oder Spritzen). Proben der Algensuspensionen wurden jeweils durch Ausplatten auf Bakterienagar bzw. mikroskopische Kontrolle (Phasenkontrast, Vergrößerung 480 x) auf Bakterienfreiheit überprüft.

Die beschriebenen Kippschwingungsgefäße lassen sich im Autoklaven sterilisieren, so daß auch größere Algenmengen bakterienfrei kultiviert werden können.

2.3. Analytische Bestimmungen

2.3.1. Extrazelluläre gelöste organische Substanz

2.3.1.1. Definition

Unter extrazellulärer gelöster organischer Substanz, im folgenden mit gel. O. S. abgekürzt, sei hier die Gesamtheit der organischen Verbindungen verstanden, die von den gesunden Algenzellen während ihres Wachstums im Medium akkumuliert werden und deren Abmessungen 0,2 µm nicht überschreiten. Der Begriff "gelöst" schließt also eventuell kolloidal vorliegende Teilchen mit ein, nicht aber z. B. größere Bruchstücke alter Zellwände (oder Bakterien).

2.3.1.2. Bestimmung

Stets gleiche Volumina (22 ml) der Algensuspension wurden sofort nach der Probenahme vakuumfiltriert. Dazu dienten Membranfilter der "Serie 113" aus Zellulose-Nitrat (Fa. Sartorius, Göttingen) mit einer Porenweite von 0,1 oder 0,2 µm. Nach der Filtration wurden die Filtrate sofort weiterverarbeitet oder bei -18°C eingefroren.

Der Bestimmung der gel. O. S. liegt eine von STRICKLAND & PARSONS (1960) beschriebene und von WEINMANN (1970) modifizierte Technik zugrunde. Es handelt sich im Prinzip um eine Naßverbrennung mit $K_2Cr_2O_7$ in konzentrierter H_2SO_4 als Oxidationsmittel und anschließende Messung der Extinktionsabnahme des Dichromations im Photometer. Die Methode wurde in der vorliegenden Arbeit weiter modifiziert: 10 ml des gut durchmischten Filtrats wurden in einem staubfreien 25-ml-Erlenmeyerkolben mit 1 ml Oxidationsmittel versetzt. Zur genauen Dosierung der Dichromat-Schwefelsäure-Lösung dienten 1-ml-Eppendorfpipetten. Die Ablaufzeit (30 sec) der viskösen Flüssigkeit mußte präzise eingehalten werden, um die notwendige Genauigkeit der Meßergebnisse zu gewährleisten. Der bei STRICKLAND & PARSONS (1960) angegebene Zusatz von Phosphorsäure zum Filtrat erwies sich unter unseren Bedingungen als unnötig.

Die Erlenmeyerkolben wurden mit Aluminiumfolie abgedeckt und 60 min bei 105,5 $\pm$ 0,1°C in Laudathermostaten erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die Proben in Meßkolben auf 25 ml aufgefüllt und ihre Extinktion in 1 cm-Küvetten im Eppendorfphotometer (Filter Hg 436 nm) gemessen. Von jeder Probe wurden zwei Parallelbestimmungen durchgeführt. Pro Serie liefen zwei Leerproben mit destilliertem Wasser sowie zwei Standardproben mit, die 150 µg C als Glucose enthielten. Der Grundgehalt an orga-

nischem Kohlenstoff in Form von EDTA in der Nährlösung beträgt etwa 2 mg C je Liter. Er wurde von den ermittelten Gesamtwerten der gel. O. S. abgezogen (s. S. 83). Die maximale Abweichung einer Einzelbestimmung vom Mittelwert der Doppelbestimmung lag während der gesamten Untersuchungen unter ± 3 %. Die Meßwerte stellen keine absoluten Werte für die gel. O. S. dar. Es handelt sich vielmehr um Vergleichswerte, bezogen auf Glucose als Eichsubstanz.

Absolute Werte wurden mit einem Kohlenstoffbestimmungsgerät der Fa. Schmizo (Zofingen, Schweiz) erhalten. Die von EGLI (persl. Mitteilung) entwickelte Methode beruht auf der Naßverbrennung organischer Substanzen zu CO_2, nachdem vorher der anorganische Kohlenstoff bei pH 3 quantitativ ausgetrieben worden ist. Die Apparatur arbeitet unter Luftabschluß. Oxidationsmittel ist $K_2S_2O_8$; ein Verbrennungsofen mit einer Temperatur von ca. 600°C sorgt zusätzlich am CuO-Kontakt für die vollständige Oxidation des entstehenden Gasgemisches, welches CO_2, CO und eventuell flüchtige organische Verbindungen enthält. Das CO_2 wird in KOH absorbiert und mit Phenolphthalein als Indikator titrimetrisch erfaßt. Da wegen des geringen organischen Gehalts der Proben für die gel. O. S.-Bestimmung mindestens 100 ml Filtrat nötig waren, eignete sich die Methode nicht für Serienbestimmungen. Auch war der Zeitbedarf für eine Bestimmung relativ groß, so daß im allgemeinen nach der Methode von WEINMANN gearbeitet wurde. Beim Vergleich beider Analysenverfahren ergab die Methode nach EGLI durchschnittlich um 5 bis 15 % höhere Werte als die optische Methode (Tab. 4).

Die Menge der gel. O. S. wird im folgenden in mg Kohlenstoff (mit Glucose als Eichsubstanz) je Liter Kulturvolumen und/oder als "relative Exkretmenge" angegeben, d. i. die auf die Einheit

Tabelle 4. Vergleich der beiden angewendeten Bestimmungsmethoden für gelösten organischen Kohlenstoff im Filtrat unterschiedlich dichter Röhrenkulturen unter Standardbedingungen (s. S. 22). Die ersten 3 Proben wurden den Kulturen während des 1. LDW, die 4. Probe am Ende des folgenden, ohne Verdünnung anschließenden LDW entnommen. Mittelwerte aus je 2 Bestimmungen.

O.D. bei 560 nm	gel. O.S. in mg C/l Suspension	
	Dichromat-methode	C-Bestimmung nach EGLI
0,21	1,9 ± 3%	2,2 ± 10%
0,26	2,5 ± 3%	2,8 ± 10%
0,68	6,9 ± 2%	7,5 ± 5%
ca. 2,0	24,2 ± 1%	25,3 ± 3%

der Biomasse bzw. eines Biomasseparamters bezogene Konzentration der gel. O. S., z. B. $\frac{\text{gel. O. S./l}}{\text{TS/l}}$, wobei die gel. O. S. in mg C/l und die TS in mg/l ausgedrückt sind. Multipliziert man die erhaltenen Werte der relativen Exkretmenge mit 100, so erhält man den gelösten organischen Kohlenstoff in % der partikulären Trockensubstanz.

Da die Optische Dichte, die in der vorliegenden Arbeit den meisten Messungen der Wachstumsleistung zugrunde liegt, als Bezugsgröße in der Literatur ungebräuchlich ist, wird anstelle des Ausdrucks gel. O. S./O. D. der Begriff gel. O. S./TS' eingeführt. Es handelt sich bei TS' um O. D.-Werte, die aufgrund der durchschnittlichen Relation O. D. 0,100 = 100 mg TS/l auf TS umgerechnet sind. Dabei wird davon ausgegangen, daß zwische O. D. und TS eine angenähert lineare Beziehung besteht (vgl. Abb. 2; S. 19).

2.3.2. Bestimmung der Wachstumsparameter

2.3.2.1. Zellzahl

Wie bei SOEDER & RIED (1962) angegeben, wurden die Zählproben unmittelbar nach Entnahme mit $K_2Cr_2O_7$ fixiert. Zur Ermittlung der Zellzahl diente eine Zählkammer nach NEUBAUER (Schichttiefe 0,1 mm). Die Zellzählung wurde mit einer Differenzierung in Einzelzellen und Coenobien sowie in Mutterzellen und Autosporen verbunden.

2.3.2.2. Trockensubstanz

Zur Bestimmung der Trockensubstanz der Algen wurden die auf Sartorius-Membranfiltern (Serie 113, Porenweite 8 µm) niedergeschlagenen Zellen 1 Std. bei 105°C getrocknet und nach Abkühlung im Exsikkator auf Raumtemperatur ausgewogen. Die Trockensubstanzmenge auf den Filtern betrug zwischen 20 und 40 mg TS/Filter.

2.3.2.3. Optische Dichte

Da in den meisten Versuchen mit Röhrenkulturen für Trockensubstanz-Bestimmungen nicht genügend Algenmaterial aus ein und derselben Kultur zur Verfügung stand, wurde als Wachstumsparameter bzw. als Maß für die Suspensionsdichte bevorzugt die Optische Dichte verwendet. Sie wurde mit dem Gibson-Filter 560 nm im Medico-Photometer in Rundküvetten von 1,5 cm Durchmesser gemessen.

Die Wachstumsleistung (Zunahme der TS oder der O. D. je LDW) wird im folgenden entweder direkt oder in % des Kontrollwertes angegeben. Ein direktes Maß für die Wachstumsleistung ist der Vermehrungsfaktor (VF; SOEDER et al. 1967); er errechnet sich aus dem Quotienten TS_{24}/TS_0, $O.D._{24}/O.D._0$ o. ä.

Die O. D.-Zunahme einer wachsenden Kultur verläuft zur Trockensubstanzzunahme im Bereich der 3. bis 9. Std. n. L. an-

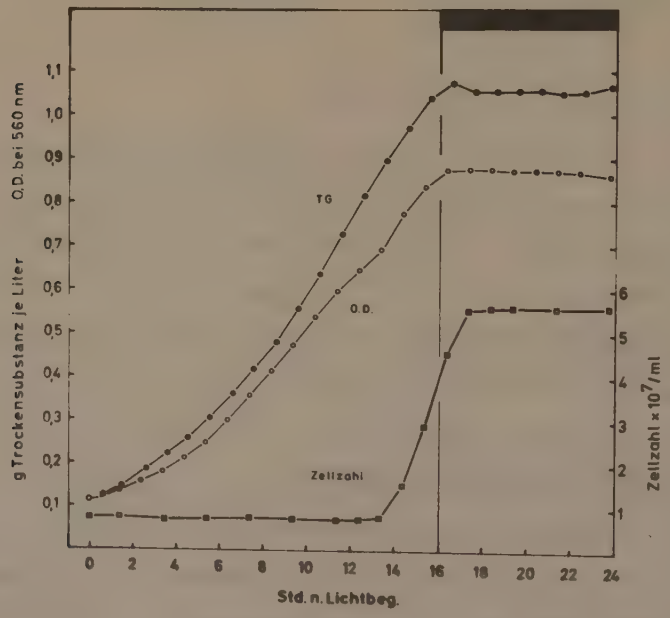


Abb. 1. Änderungen des Trockengewichts, der Optischen Dichte und der Zellzahl von Scenedesmus 276 - 3a im Licht-Dunkelwechsel unter Standardbedingungen (vgl. S. 22). Die Werte stellen Mittel aus 2 Parallelversuchen (d. h. im Lichtthermostaten nebeneinanderstehenden Kulturröhren) dar. Die maximale Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert liegt bei weniger als $\pm$ 2 %. Der Verlauf der O.D.-Kurve einschließlich des Knicks (13. Std. n. L.) ist typisch und wurde in allen entsprechenden Versuchen erhalten.

nähernd parallel. Etwa von der 10. Std. n. L. an divergieren beide Kurven, indem sich die Steigung der O. D.-Kurve relativ zu der der Trockensubstanzkurve verringert (Abb. 1). Trägt man die während eines Licht-Dunkelwechsels erhaltenen O. D.-Werte gegen die entsprechenden Trockensubstanzwerte auf, so ergibt sich zwischen diesen beiden Wachstumsparametern auch unter anderen als Standardbedingungen (s. S. 22) eine mehr oder minder lineare Beziehung (Abb. 2).

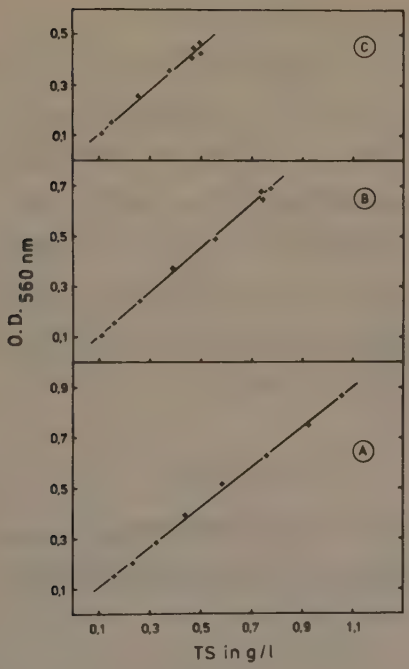


Abb. 2.
Auftragung der aus Standard-Röhrenkulturen (s. S. 22; A), Kippschwingungskulturen (Anzuchtbedingungen s. S. 9; B) und Sulfatmangel-Kulturen ($[SO_4^{--}]_0 = 1{,}5 \times 10^{-5}$ M; C) zu verschiedenen Zeitpunkten des LDW erhaltenen TS-Werte gegen die zum entsprechenden Zeitpunkt vorliegenden O. D.-Werte. Jeweils Mittelwerte aus 2 Parallelversuchen. Die Gleichungen für die Regressionsgeraden lauten:
A: $y = 0{,}0795\,x + 0{,}0251$
B: $y = 0{,}0878\,x + 0{,}0128$
C: $y = 0{,}0870\,x + 0{,}0158$

2.3.2.4. Chlorophyll

Da die sofortige Aufbereitung meist nicht möglich war, wurden die Proben zunächst unter Zusatz von Na_2CO_3 (eine Spa-

telspitze auf 15 ml) eingefroren. Nach Zentrifugation der 5-ml-Proben wurde das Chlorophyll nach der Methode von BÖGER (1964) mit 95 %igem Methanol 30 min bei 65°C extrahiert. Die Extinktion der Extrakte wurde in einem Spektralphotometer der Fa. Zeiss (Typ PMQ III) bei 650 und 665 nm ermittelt. Der Bestimmung des Gesamtchlorophylls liegt folgende Beziehung zugrunde (MACKINNEY 1941):

mg Chlorophyll (a + b) = $2{,}55 \times 10^{-2} \times E_{650} + 0{,}4 \times 10^{-2} \times E_{66}$

2.3.2.5. Gesamtstickstoff und Rohprotein

Der Gesamtstickstoff der Algenzellen wurde nach der Mikrokjeldahlmethode bestimmt. Durch Multiplikation mit dem Faktor 6,25 wurde in der üblichen Weise auf Rohprotein umgerechnet.

Der Peptid- bzw. Aminosäure-Anteil an der gel. O. S. dagegen wurde nach der Methode von LOWRY et al. (1951) ermittelt, die sowohl Peptidbindungen mit dem Biuretreagenz als auch zyklische Aminosäuren mit dem Folin-Reagenz erfaßt. Als Eichsubstanz diente Serumalbumin (Fraktion V; Merck).

2.3.2.6. Kohlenhydrat

Der Kohlenhydratgehalt der Zellsubstanz wurde nach 2-stündiger Hydrolyse der Algen mit der Anthronmethode (ROE 1955) bestimmt.

Ebenfalls mit der Anthronmethode wurden die Filtrate der Algensuspenionen untersucht. Da sich die hohe Nitratkonzentration der Nährlösung störend auf die Kohlenhydratbestimmung auswirkt (zu hohe Werte!), war zunächst eine Abtrennung des Nitrats erforderlich. Dazu wurde das Filtrat im Rotationsverdampfer bei 30°C 20-fach eingeengt und über eine Sephadex-G15-Säule fraktioniert (Länge der Säule: 46,5 cm; Durchmesser:

1,2 cm; Durchflußgeschwindigkeit: ca. 15 ml/Std.). Das Eluat wurde mit Hilfe des Fraktionssammlers LKB Ultrorac 7000 in Fraktionen von je 1,22 ml aufgefangen. Die vordere Ausschlußgrenze der Säule lag bei Fraktion Nr. 17, die hintere bei Fraktion Nr. 37. Elutionsdiagramme im UV-Bereich und UV-Spektren einzelner Fraktionen wurden mit dem Double Beam Spectrophotometer UV 200 der Fa. Shimadzu aufgenommen. Der Kohlenhydratgehalt der Fraktionen wurde zum Teil mit dem Autoanalyzer I der Fa. Technicon ermittelt (vgl. dazu ALBRECHT & OVERBECK 1969).

2.3.2.7. Glykolsäure

Glykolsäure-Bestimmungen im Filtrat erfolgten nach der Methode von CALKINS (1943). Dabei entsteht mit 2,7-Dihydroxynaphthalin eine Rotfärbung, deren Intensität im Spektralphotometer bei 525 nm gemessen wird. Da Nitrat bei der Bestimmung stört, wurde es zuvor, wie bei ZELITCH (1958) beschrieben, auf einer Dowex 1-X-10 Acetat-Anionenaustauschersäule abgetrennt. (Zur Spezifität der CALKINS-Reaktion vgl. BADOUR & WAYGOOD 1970.)

2.3.2.8. Aschegehalt

Die Bestimmung des Aschegehalts erfolgte durch Veraschung der vorgetrockneten Algensubstanz im Muffelofen über 6 Std. bei maximal 450°C und anschließende Wägung.

2.3.3. Auswertung

Vorversuche ergaben, daß es in den Synchronkulturen von Scenedesmus 276 - 3a zu relativ kurzfristigen Konzentrationsänderungen der gel. O. S. kommt. Ein zeitlicher Abstand von höchstens 1 Std. zwischen den Probenahmen erschien deshalb an-

gemessen. Da das Volumen der verwendeten Kulturröhren nur eine begrenzte Zahl von Bestimmungen zuläßt, wurden Teilzyklen von je 8 bis 10 Std. untersucht und die Kurvenverläufe der einzelnen Abschnitte zu einer Gesamtkurve kombiniert. Bestimmungen in Intervallen von 3 bis 4 Std. über den gesamten 24-Std.-Zyklus an Material aus einer einzigen Kultur bestätigten den so ermittelten Kurvenverlauf.

Wo es möglich war, wurden Standardabweichungen und Signifikanzschranken (t-Test) ermittelt. Nach SOEDER et al. (1967) liegt bei konstanten Anzuchtbedingungen eine Normalverteilung der Vermehrungsfaktoren vor. Die maximale Abweichung der Einzelmeßwerte vom Mittelwert mehrerer Parallelversuche (d. h. nebeneinanderstehender Kulturröhren) beträgt in allen Versuchen normalerweise weniger als $\pm$ 5 %.

Sofern nicht anders angegeben, liegen den Tabellen und Kurven Messungen an Synchronkulturen von Scenedesmus 276 - 3a unter Standardbedingungen zugrunde:

Anzucht in Kulturröhren (vgl. S. 8) LDW von 16 : 8 Std.
30°C 15 klux N_8-Nährlösung O. $D._0$ = 0,12
1 Vol.% CO_2 in Luft bei 16 l Gas je Std. und Kulturröhre

3. Ergebnisse

3.1. Wachstumsverlauf der Algen im LDW

3.1.1. Wachstum und Entwicklung in Röhrenkulturen

Bei der Kultur von Scenedesmus acutus var. alternans in Licht-Dunkelwechseln mit einer Gesamtdauer von 24 Std. treten unter Optimalbedingungen gewisse Komplikationen auf, da kürzestmögliche Entwicklungsdauer (vgl. LORENZEN & SCHLEIF 1966) und Länge des externen Zyklus nicht übereinstimmen. Kultiviert man Scenedesmus 276 - 3a bei niedriger Suspensionsdichte und 30°C im LDW von 16 : 8 Std., so kommt es 13 bis 16 Std. n. L., d. h. vor Ende der Lichtphase, zu einer ersten Autosporenfreisetzung, und ca. 50 % der Zellen setzen gegen Ende der Dunkelphase nochmals Autosporen frei (MEFFERT & OVERBECK 1968). Dabei wird insgesamt ein Vermehrungsfaktor von etwa 20 erreicht. Um Scenedesmus acutus var. alternans vollsynchron zu kultivieren, wie dies bei Chlorella fusca (LORENZEN & SCHLEIF 1966) und anderen Objekten bei einer LDW-Länge von 24 Std. unschwer gelingt, nahm SENGER (1970) die Anzucht von Scenedesmus bei der suboptimalen Temperatur von 25°C vor. Der gleiche Effekt wurde bei uns durch Erhöhung der Suspensionsdichte, d. h. durch verminderten Lichtgenuß der Einzelzelle erzielt.

Die Änderungen von Suspensionsdichte und Zellzahl im Verlauf der vollsynchronen Zellentwicklung sind in Abb. 1 (S. 18) dargestellt. Im Gegensatz zu dem exakt zweiphasig-exponentiellen Anstieg der Trockensubstanz je Volumeneinheit, der für Synchronkulturen von Chlorella nachgewiesen wurde (SOEDER 1967), liegt im vorliegenden System keine einfache Wachstumskinetik vor (Abb. 3). Die Autosporenfreisetzung (Freisetzung der zu 90 % achtzelligen Tochtercoenobien) beginnt 13 bis 14 Std. n. L. und

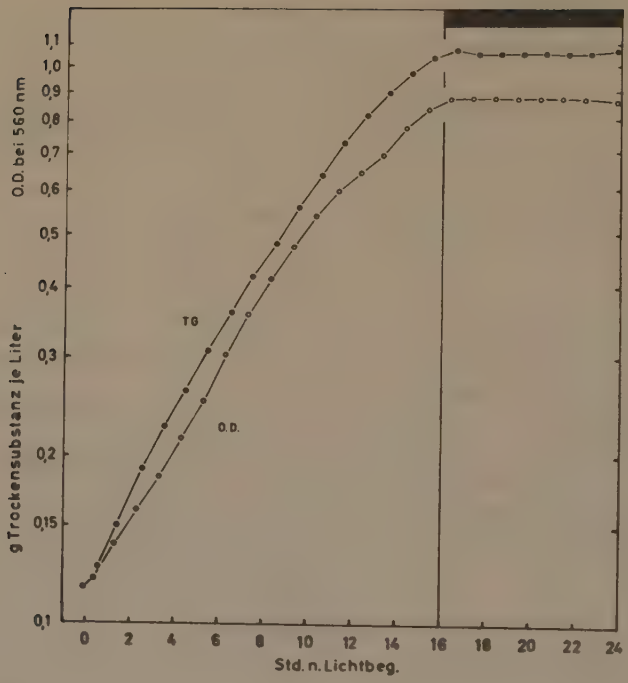


Abb. 3. Halblogarithmische Auftragung der in Abb. 1 (S. 18) dargestellten O.D.- und TS-Kurven im Verlauf des Licht-Dunkelwechsels. Vgl. auch Legende der Abb. 1.

ist 17 bis 18 Std. n. L. abgeschlossen. Bei dem Objekt von SENGER (1970) beginnt sie dagegen erst 19 Std. n. L. Nach SOEDER (unveröff.) handelt es sich um stammspezifische Unterschiede der Rhythmik.

Während der gesamten Dunkelphase vermindert sich die Trockensubstanz von Scenedesmus 276 - 3a nur um wenige Prozent, während z. B. Synchronkulturen von Chlorella fusca im gleichen Zeitraum rund 20 % der Biomasse durch Dissimilation verlieren (SOEDER 1970).

3.1.2. Wachstum und Entwicklung in Kippschwingungsgefäßen

Scenedesmus-Kulturen, die in Kippschwingungsgefäßen angezogen wurden, unterscheiden sich in ihrem Wachstumsverhalten nicht wesentlich von Röhrenkulturen (Abb. 4). Allerdings bleibt ihre Wachstumsleistung um 10 bis 25 % hinter Röhrenkulturen entsprechender Dichte zurück (Tab. 5; S. 28).

Die Änderungen der Chlorophyll-, Protein- und Kohlenhydratgehalte der Zellen im Verlauf des LDW (Abb. 5) stimmen im wesentlichen mit den von RUPPEL (1962) für Chlorella und MÜLLER (1961) für Scenedesmus obliquus dargestellten Verhältnissen überein. Im Bereich zwischen der 5. und 9. Std. n. L. zeichnen

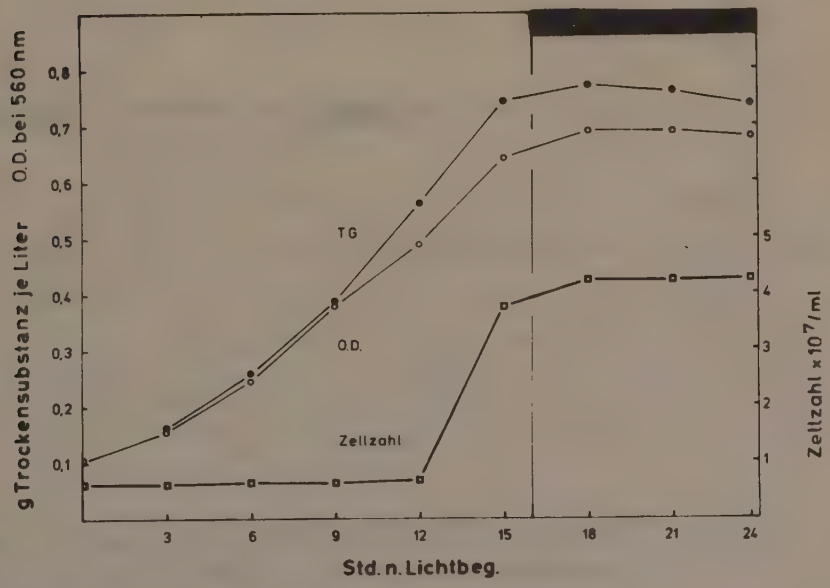


Abb. 4. Verlauf der TG-, O.D.- und Zellzahl-Kurven in synchronen Kippschwingungskulturen von Scenedesmus 276 - 3a während des LDW. Anzuchtbedingungen s. S. 9. Mittelwerte aus 2 Parallelkulturen.

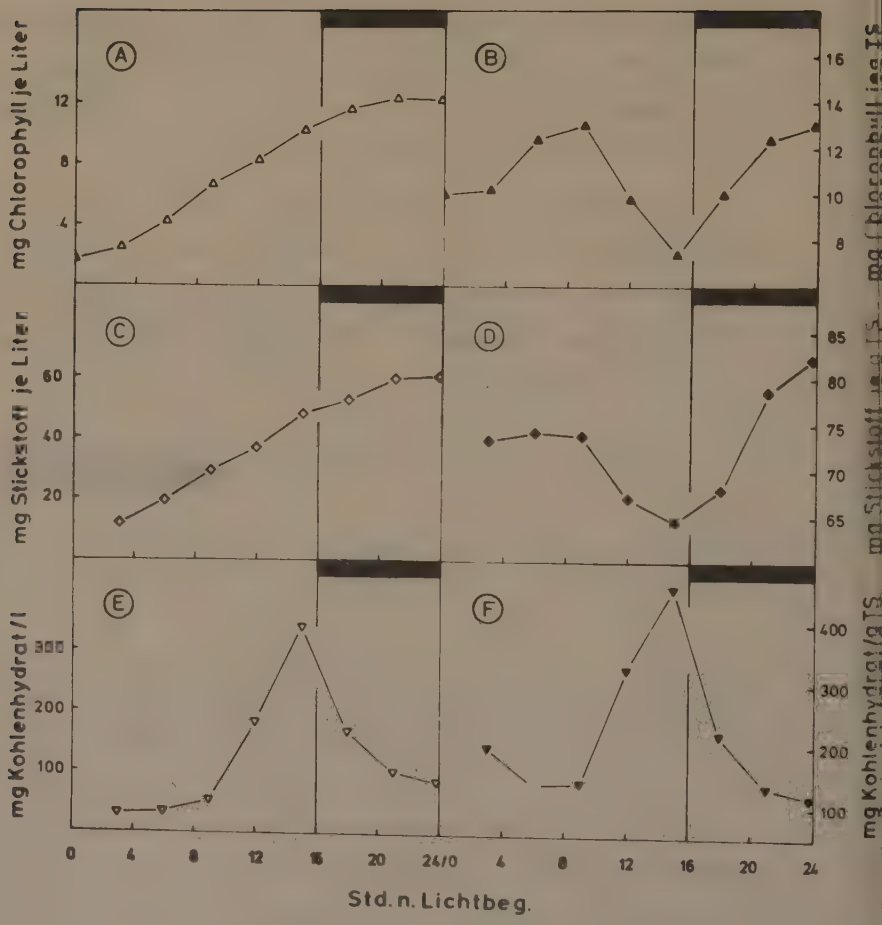


Abb. 5. Änderungen von Chlorophyll (A, B), zellgebundenem Stickstoff (C, D) und Kohlenhydrat (E, F) je Volumeneinheit der Suspension und bezogen auf TS im Verlauf des LDW. Es handelt sich um die gleichen Kippschwingungskulturen wie in Abb. 4.

sich die Algenzellen durch eine intensive Zunahme des Chlorophyllgehalts aus, der etwa zur 9. Std. n. L. ein Maximum erreicht (Abb. 5 A, B). Nach den Untersuchungen von SENGER (1970) erreichen lichtsaturierte Synchronkulturen von Scenedesmus obliquus etwa 8 Std. n. L. ein Maximum der photosynthetischen Sauerstoffproduktion (bezogen auf packed cell volume). Während in der ersten Hälfte der Lichtphase die Proteinzunahme der Zellen (bezogen auf Kulturvolumen) die Zunahme der Kohlenhydrate übertrifft, rückt in der zweiten Hälfte der Lichtphase die Kohlenhydratsynthese stark in den Vordergrund (s. auch SUNDBERG & NILSHAMMAR-HOLMVALL 1975). Dies scheint bei coccalen Grünalgen allgemeiner verbreitet zu sein (vgl. GALLOWAY et al. 1974).

3.1.3. Abhängigkeit der Wachstumsleistung von der Suspensionsdichte

Die als Vermehrungsfaktor (vgl. S. 18) ausgedrückte Wachstumsleistung von Scenedesmus-Laborkulturen ist im betrachteten lichtlimitierten Bereich eine Funktion der Kulturdichte, welche bei der Verdünnung der Suspension eingestellt wird. Diese Beziehung ist in Tabelle 5 dargestellt. Sie beruht im wesentlichen auf der Änderung des durchschnittlichen Lichtgenusses als Folge der Änderung der Kulturdichte.

Mit abnehmender Ausgangsdichte der Suspension ist eine gewisse Verkürzung des Entwicklungsganges und damit eine Vorverlegung der AFS festzustellen. So beginnen die Mutterzellen bei einer Ausgangsdichte von 0,23, ihre Autosporen erst nach der 17. Std. n. L. zu entlassen, bei der Standarddichte von 0,12 aber bereits zur 14. Std. n. L. Die jungen Zellen wachsen ihrerseits bis zum Ende der Lichtzeit weiter und tragen zur Ver-

Tabelle 5. Abhängigkeit des Vermehrungsfaktors (VF) von der Ausgangsdichte $O.D._0$, in Röhren- und Kippschwingungskulturen von Scenedesmus 276 - 3a. Mittelwerte aus 2 bis 4 Versuchen. Die maximale Abweichung vom Mittelwert liegt bei $\pm$ 5 %.

	Zahl der Versuche	$O.\ D._0$	VF
Röhrenkultur	2	0,42	2,3
	2	0,23	3,0
	2	0,16	4,9
	4	0,13	6,1
	2	0,11	7,9
	3	0,09	9,6
Kippschwingungskultur	1	0,31	1,5
	2	0,125	5,2
	2	0,11	5,8
	4	0,10	6,5
	3	0,09	7,0
	2	0,065	8,3
	2	0,045	9,4

mehrung der Biomasse bei. Bei der Ausgangsdichte $O.\ D._0 = 0,12$, die dem Großteil der Versuche zugrunde liegt, erreichen die Kulturen unter den Standardbedingungen (s. S. 22) einen Vermehrungsfaktor von durchschnittlich $f_{O.D.} = 7,1 \pm 10$ %, d. h. sie wachsen innerhalb 24 Std. bis zu einer O. D. von ca. 0,85 heran (Abb. 1; S. 18).

3.2. Konzentrationsänderungen der extrazellulären gelösten organischen Substanz im Tagesgang

3.2.1. Laborkulturen im LDW

In den ersten 1,5 Std. n. L. tritt unter Standardbedingungen (s. S. 22) ein erstes Maximum der Konzentration gelöster O. S. auf, ein weiteres folgt zur 6. Std. n. L. (Abb. 6). Während der Periode maximaler Biomassezunahme je Volumen- und Zeiteinheit (7. bis 12. Std. n. L.) bleibt die Konzentration der gel. O. S. auf einem niedrigen Niveau. Die geringste relative Exkretmenge (bezogen auf TS'; s. S. 16) liegt zur 11. Std. n. L. vor

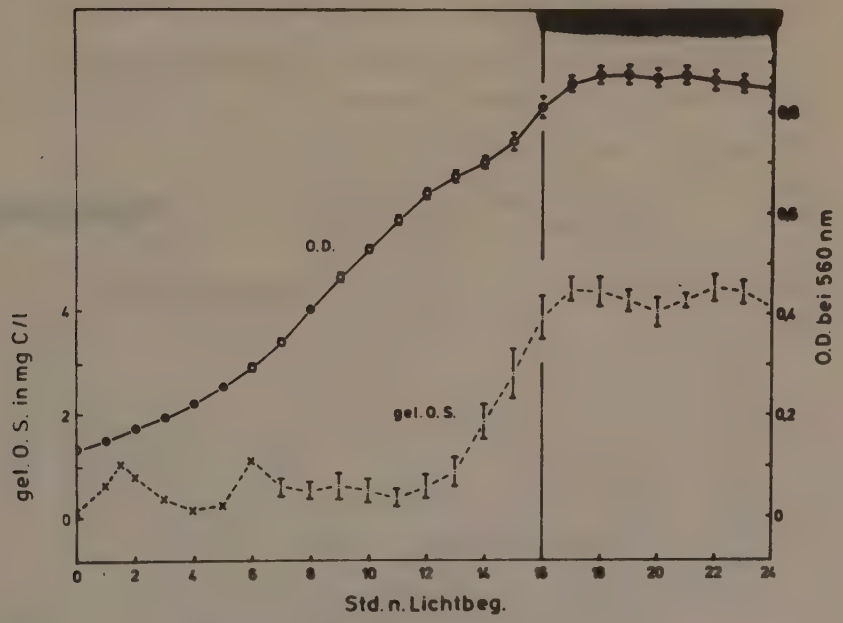


Abb. 6. O. D. und gel. O. S. je 1 Suspension (Eichsubstanz: Glucose) im Verlauf des LDW unter Standardbedingungen. Es handelt sich um Mittelwerte aus 6 Versuchen, bei denen ab der 7. Std. n. L. Standardabweichungen angegeben werden (näheres im Text).

(Abb. 7). Ab der 12. Std. n. L. nimmt die Konzentration gelöster O. S. zu und erreicht nach der 1. Dunkelstunde (17 Std. n. L.) den Maximalwert im Verlauf des LDW (Abb. 6, 7). Da gleichzeitig mit dem Anstieg der Exkretmenge im Medium eine deutliche Verminderung der Biomassezunahme zu beobachten ist (Abb. 3; S. 24), liegt es nahe anzunehmen, daß diese auf den Verlust organischer Substanz zurückgeht. Jedoch ergibt eine Überschlagsrechnung, daß die Verringerung der Substanzproduktion nur zu etwa 5 % durch Abgabe organischen Materials an das Medium bedingt sein kann.

Nach Erreichen des Maximums zur 17. Std. n. L. fällt die Konzentration der gel. O. S. zunächst leicht ab und steigt nach Durchlaufen eines leichten Minimums (20 Std. n. L.) wieder an (Abb. 6, 7). Dieser Kurvenverlauf war in allen Einzelversuchen reproduzierbar.

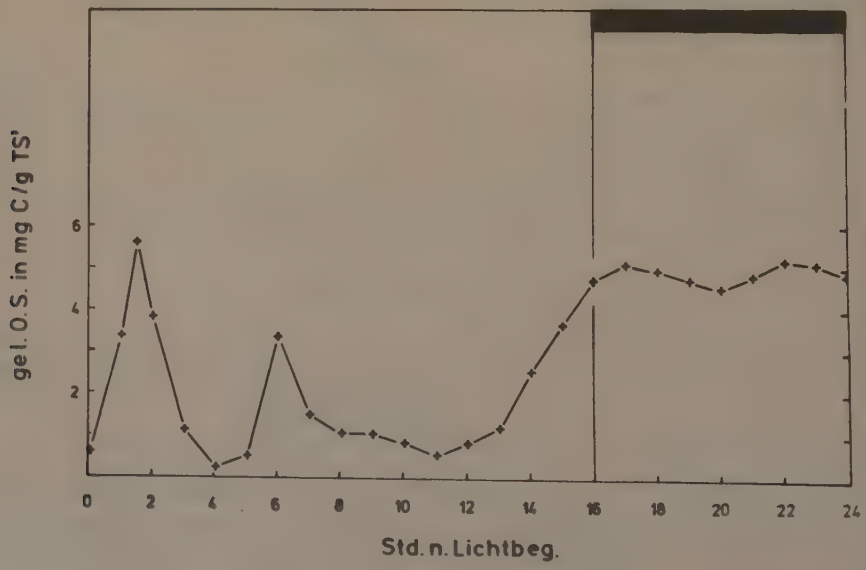


Abb. 7. Änderungen der relativen Exkretmenge (s. S. 15) während des LDW. Der Kurve liegen die Werte der Abb. 6 zugrunde.

Wie aus den Abb. 6 und 7 zu ersehen, steigt die Exkretmenge unter Standardbedingungen unmittelbar nach Lichtbeginn an; man könnte vermuten, daß der erste Peak auf einen Effekt der Verdünnung oder der plötzlich einsetzenden Belichtung zurückgeht. Zur Klärung wurden Versuche mit folgenden Bedingungen angesetzt:

1. Die Verdünnung der Suspension erfolgte schon 2 Std. vor Lichtbeginn, also noch während der Dunkelphase,
2. die Kultur wurde nach Ablauf des Entwicklungszyklus nicht verdünnt.

Abbildung 8 zeigt, daß weder bei Verdünnung im Dunkeln (A) noch bei unverdünnten Kulturen (B) wesentliche Abweichungen

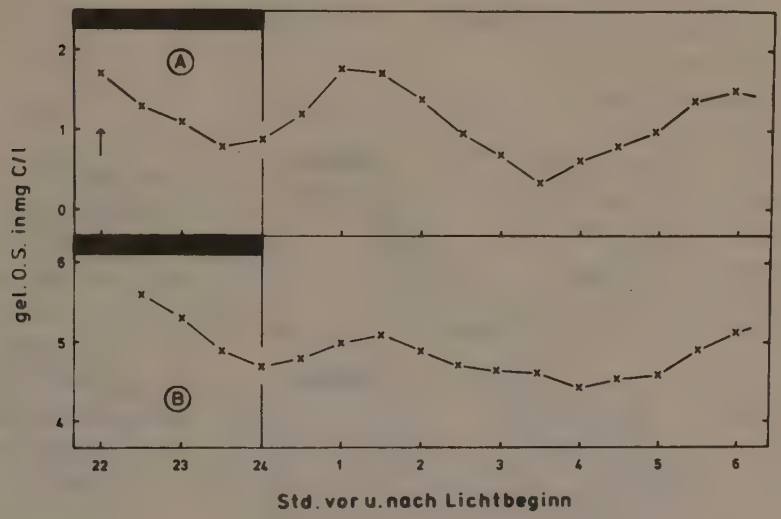


Abb. 8. Konzentrationsänderungen der gel. O. S. (Eichsubstanz: Glucose) in Standardkulturen 2 Std. vor bis 6 Std. nach Lichtbeginn. (A): Die Verdünnung (Pfeil) erfolgte bereits 2 Std. vor Lichtbeginn (Mittelwerte aus 3 Parallelversuchen). (B): Kurvenverlauf der Werte gelöster O. S. bei nicht verdünnten Kulturen (Mittelwerte aus 2 Parallelversuchen).

vom Kurvenverlauf unter Standardbedingungen auftreten. Ein Verdünnungseffekt konnte damit ausgeschlossen werden. Später stellte sich bei CO_2-Mangelkulturen heraus, daß auch der Lichtbeginn nicht als Ursache für das erste Maximum der Menge gelöster O. S. in Betracht kommt. Bei solchen Kulturen tritt der erste Peak etwa 24 Std. n. L. auf, d. h. er ist bereits ausgebildet, wenn die Belichtung einsetzt (vgl. Abb. 20 B, C; S. 51).

Die Konzentrationsänderungen der gel. O. S. verlaufen bei der Kultur von Scenedesmus in Kippschwingungsgefäßen ähnlich wie in Röhrenkulturen (Abb. 9). Jedoch wird insgesamt weniger gel. O. S. akkumuliert. Die Amplitude der Konzentrationsänderungen ist gegenüber den Verhältnissen in Röhrenkulturen vermindert.

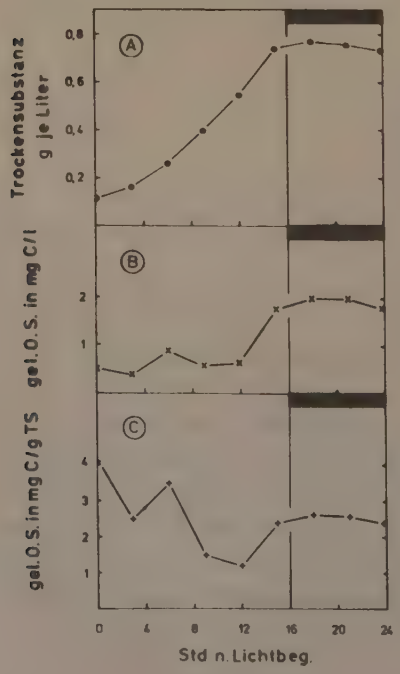


Abb. 9.
Änderung der Kulturdichte (A) und Konzentration gelöster O. S. (B, C; Eichsubstanz: Glucose) während des LDW bei Kultur von Scenedesmus 276 - 3a in Kippschwingungsgefäßen (Anzuchtbedingungen s. S. 9). Mittelwerte aus 2 Versuchen.

3.2.2. Versuche zur chemischen Analyse der gel. O. S.

Die UV-Absorptionsspektren einzelner Fraktionen der über Sephadex G-15 fraktionierten Filtrate (Abb. 10) sowie die Elutionsdiagramme bei 260 nm (Abb. 11 a) ergaben, daß es sich bei der gel. O. S. um ein Gemisch sehr verschiedener Verbindungen handelt. Z. B. unterscheidet sich die Fraktion 33 hinsichtlich ihres UV-Absorptionsspektrums eindeutig von den Spektren der vorhergehenden bzw. der nachfolgenden Fraktionen (Abb. 10).

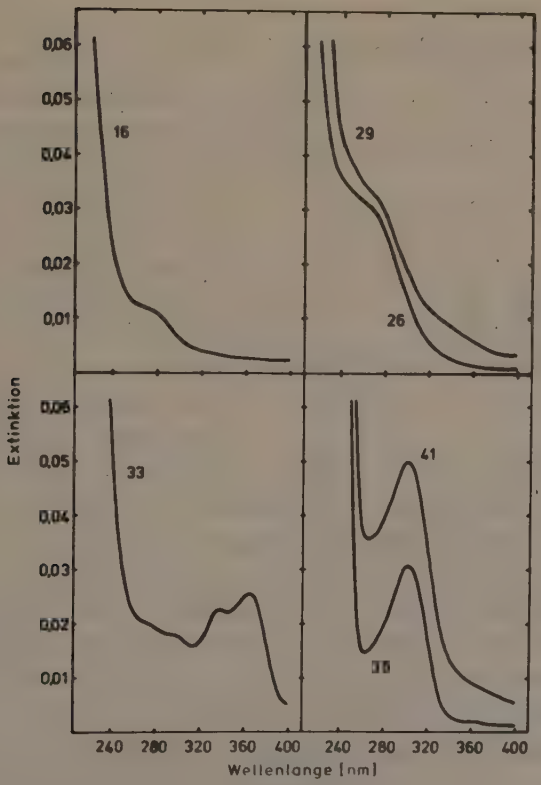


Abb. 10. UV-Absorptionsspektren einiger Fraktionen des Filtrats einer Standardkultur zwischen 400 und ca. 240 nm. Die Zahlen geben die Fraktionsnummern an.

Der Anteil organischer Verbindungen mit mittlerem und höherem Molekulargewicht (> 400) an der gel. O. S. liegt unter Standardbedingungen bei ca. 80 % (Abb. 11 b). Er setzt

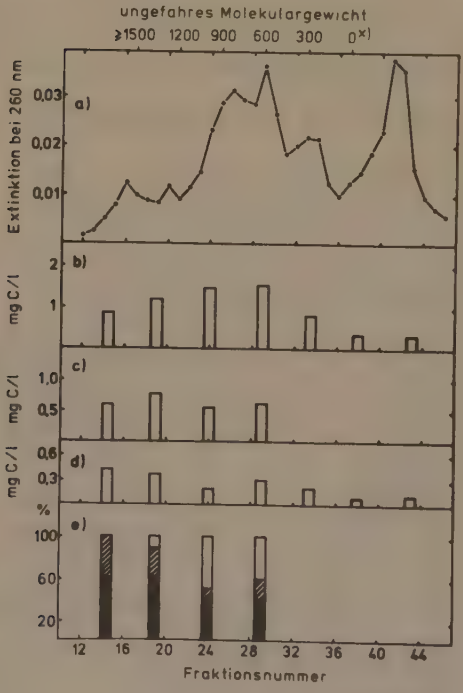


Abb. 11.
Analyse des über Sephadex G-15 fraktionierten Filtrats aus Standardkulturen (s. S. 22).

a) Elutionsdiagramm bei 260 nm,

b) Konzentration der gel. O. S. (Eichsubstanz: Glucose) in einzelnen Fraktionsgruppen (4 bis 7 Fraktionen wurden jeweils zu einer Fraktionsgruppe vereinigt),

c) Kohlenhydrate in mg C/l (Eichsubstanz: Glucose),

d) Peptide und freie Aminosäuren in mg C/l (die Umrechnung der Peptide in Peptid-Kohlenstoff erfolgte unter Berücksichtigung der Befunde, die GOCKE (1969) über die Aminosäure-Zusammensetzung der in Scenedesmus quadricauda-Kulturen vorliegenden extrazellulären Peptide erhob),

e) prozentualer Anteil der Peptide (schraffiert) und Kohlenhydrate (schwarz) an der gel. O. S. der jeweils entsprechenden Fraktionsgruppe.

Mittelwerte aus je 2 Parallelversuchen.

x) Bei Substanzen mit einem Molekulargewicht von ≤ 0 handelt es sich um Substanzen, deren Austritt aus der Säule verzögert wird.

sich zu über 20 % aus Peptiden und zu etwa 50 % aus Kohlenhydraten zusammen. Die Anteile der Kohlenhydrate und Peptide an einzelnen Fraktionsgruppen des Filtrats sind aus Abbildung 11 c) bzw. d) ersichtlich. (Die Kohlenhydratkonzentration kann von der 32. Fraktion an, d. h. in Verbindungen mit Molekulargewichten < 400, nicht mehr mit der Anthronmethode ermittelt werden, da hier störende Substanzen, u. a. Nitrat, auftreten.) In den Fraktionen mit "hochmolekularen" Verbindungen (Molekulargewicht $\geqslant$ 1500) liegen 95 % der gel. O. S. als Peptide + Kohlenhydrate vor (Abb. 11 e). Dabei überwiegen die Kohlenhydrate mit etwa 60 %.

Glykolat konnte am Ende des LDW nur in äußerst geringen Konzentrationen nachgewiesen werden (Größenordnung: 1 µg Glykolat/l). Stichproben zur Mitte der Lichtphase führten zum gleichen Ergebnis.

3.2.3. Freilandkulturen unter natürlichen Bedingungen

In Freilandkulturen von Scenedesmus 276 - 3a durchläuft die Konzentration der gel. O. S. in den Mittagsstunden ein Minimum (Abb. 12). In mäßig dichten Kulturen (O. D. = ca. 0,4) schwankt der Gehalt der gel. O. S. im Medium zwischen 2 und 3,5 mg/l. In Kulturen mit Optischen Dichten von 0,6 bis 0,8 wurden Konzentrationen zwischen 3,5 und 4,5 mg C/l gemessen. Die Exkretkonzentrationen liegen also etwa in der gleichen Größenordnung wie in Röhrenkulturen (Abb. 6; S. 29).

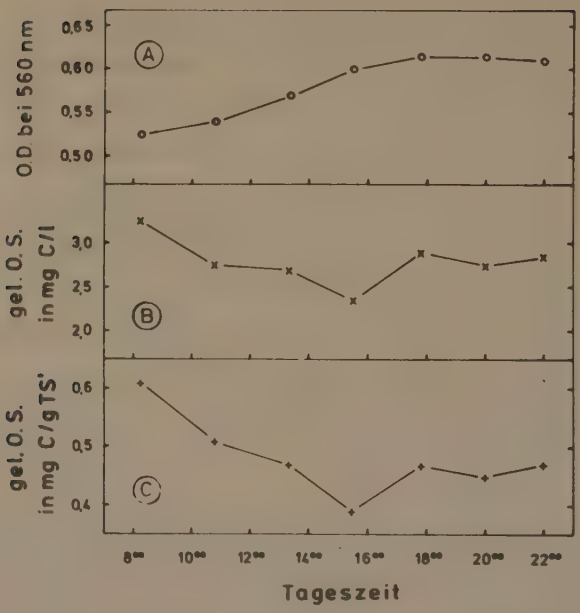


Abb. 12. Verlauf der O. D. (A) und Konzentrationsänderungen der gel. O. S. (B, C; Eichsubstanz: Glucose) im Freilandbecken Nr. 5 am 15. 6. 1972. Es handelt sich um eine Scenedesmus 276 - 3a - Kultur in Scenedin-Harnstoff-Medium. Wetter: ständig bedeckter Himmel, nach 18.00 Uhr auch mit einzelnen leichten Regenfällen. Die hier wiedergegebenen Konzentrationsänderungen der gel. O. S. sind typisch und wurden auch in anderen Messungen erhalten.

3.3. Akkumulation gelöster organischer Substanz in Abhängigkeit von physikalischen Faktoren und von der CO_2-Versorgung

Nachdem im vorangehenden Kapitel die Abhängigkeit der Akkumulation gelöster organischer Substanz vom Entwicklungsstadium dargestellt wurde, soll im folgenden untersucht werden, in welcher Beziehung die bei Änderung der Kulturbedingungen zu erwartenden Produktivitätsunterschiede zur Akkumulation der gel.

O. S. im Medium stehen. Ausgehend von der Arbeitshypothese, daß Stoffwechselungleichgewichte zu den allgemeinen Bedingungen gehören sollten, die eine Abgabe organischer Verbindungen an das Medium und damit die Akkumulation der gel. O. S. fördern, wurde die Konzentration der gel. O. S. insbesondere während der Adaptation der Algen an die veränderten Bedingungen untersucht. Das Auftreten von Stoffwechselungleichgewichten sollte ja gerade während der Adaptation an veränderte Außenfaktoren begünstigt sein. Doch wurden auch voll- oder weitgehend adaptierte Kulturen zu den Untersuchungen herangezogen (zur Problematik der Adaptation vgl. Abschnitt 4.1.2., S. 82).

3.3.1. Licht

3.3.1.1. Lichtintensität

Setzt man bei der Synchronkultur von Scenedesmus 276 - 3a die Beleuchtungsstärke von 15 klux auf 7 klux herab, so wird die Wachstumsleistung deutlich vermindert. Der Vermehrungsfaktor $f_{O.D.}$ sinkt um 50 % von 7,2 auf 3,6 (Tab. 6). Außerdem bedingt die verminderte Lichtintensität eine deutliche Verzögerung der AFS. Haben bei 15 klux 50 bis 60 % aller Mutterzellen zur 15. Std. n. L. Tochtercoenobien freigesetzt, so beträgt dieser Prozentsatz bei Bestrahlung mit 7 klux während der Lichtphase des LDW nur ca. 5 %. Schwächt man die Beleuchtungsstärke noch weiter ab, so liegt schließlich der Beginn der AFS erst nach dem Abschluß des 24-Std.-Zyklus, und erst zu Beginn der 2. Lichtperiode sind einzelne Tochtercoenobien nachzuweisen. Eine Verlängerung der Entwicklungsdauer infolge schwacher Lichtintensität wurde u. a. von ŠETLIK et al. (1972) für Scenedesmus quadricauda und von SENGER (1961) auch für synchrone Chlorella-Kulturen beschrieben.

Eine Verminderung der Beleuchtungsstärke hat zunächst einen fördernden Einfluß auf die TS'-bezogene Konzentration der gel. O. S. im Medium (Tab. 6). Sie erhöht sich während des 1. LDW der Adaptation an 7 klux auf das Doppelte, bei 4 klux auf das 2,8-fache der Kontrolle. Bei 1 klux, d. h. bei extrem niedriger Produktivität sinkt die Konzentration der gel. O. S. unter den Kontrollwert (Kultur bei 15 klux; Tab. 6). Diese Befunde lassen erkennen, daß die Adaptation der Kulturen an verminderte Lichtintensität mit einer erheblichen Steigerung der relativen Exkretmengen einhergeht, sofern ein gewisses Maß an Produktivität der Zellen (etwa ein Drittel der unter Standardbedingungen erreichten Wachstumsleistung) nicht unterschritten wird. Eine Steigerung der Exkretion organischer Substanzen bei geringer Lichtintensität wurde auch in Feldversuchen mit der Blaualge Synechococcus lividus beobachtet, wobei es aber im extremen

Tabelle 6. Einfluß der Lichtintensität auf das Wachstum und die zur 24. Std. n. L. vorliegende Menge gelöster O. S. (Eichsubstanz: Glucose) im 1. LDW nach Änderung der Lichtintensität sowie nach Adaptation. Angaben zum Teil in % der bei 15 klux angezogenen Kulturen. Standardbedingungen. Mittelwerte aus 2 bis 3 Parallelkulturen.

Beleuchtungsstärke während der Lichtphase des LDW klux	$O.D._{24}$	% $f_{O.D.}$	gel. O. S.			
			mg C/l	%	mg C/g TS'	%
15	0,861	100	4,2	100	4,9	100
7	0,441	51	4,3	103	9,8	200
4	0,283	33	3,9	95	13,7	280
1	0,146	17	0,6	14	4,1	89
7; adaptiert	0,456	53	3,5	85	7,7	165

Schwachlicht nicht zu einer Konzentrationsabnahme der gel. O. S. kam (BAULD & BROCK 1974).

Die Kinetik der Konzentrationsänderungen der gel. O. S. während der Adaptation an verminderte Lichtintensität (15 → 7 klux) wurde stichprobenweise untersucht. Die in 7 klux überführte Kultur weicht darin von der 15 klux-Kontrolle ab, daß der Konzentrationsanstieg der gel. O. S., der unter Standardbedingungen in den letzten Stunden der Lichtphase auftritt,

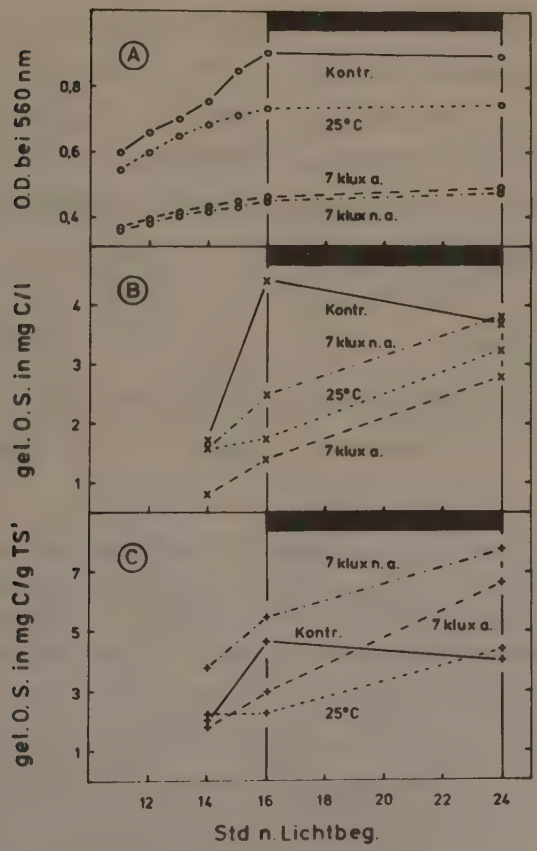


Abb. 13.
O. D. (A) und Menge gelöster O. S. (B, C; Eichsubstanz: Glucose) vor Beginn der Dunkelzeit und zur 24. Std. n. L. bei erniedrigter Beleuchtungsstärke (7 klux) oder Temperatur (25°C). Eine Kultur wurde vor Versuchsbeginn über 3 LDW an die schwache Lichtintensität adaptiert (7 klux a.). Mittelwerte aus je 2 Parallelversuchen.

Kontr. Kontrolle
7 klux a. adaptierte Kultur bei 7 klux
7 klux n. a. nicht adaptierte Kultur bei 7 klux

sich in die Dunkelphase hinein fortsetzt (Abb. 13 B, C: 7 klux n. a.). Inwieweit dies mit dem bei 7 klux verlangsamten Entwicklungsverlauf (vgl. S. 37) in Verbindung steht, wurde nicht im einzelnen untersucht.

Um zu prüfen, ob es sich bei den beobachteten hohen Exkretmengen lediglich um Übergangseffekte handelt, wurden Kulturen in Schwachlicht (7 klux) vorkultiviert, bis eine gleichbleibende O. $D._{24}$ erreicht wurde (3 Tage). Es zeigte sich, daß auch hier die relative Exkretmenge stark gegenüber Standardbedingungen erhöht ist (Tab. 6) und daß eine ähnliche Kinetik der Konzentrationsänderungen der gel. O. S. vorliegt wie in Schwachlichtkulturen in der Übergangsphase (Abb. 13 B, C: 7 klux a.). Die bei Anzucht in mäßigem Schwachlicht festgestellte Erhöhung der relativen Exkretmenge ist somit im wesentlichen kein Adaptationseffekt.

3.3.1.2. Lichtregime

Vergleicht man asynchrone Dauerlicht-Kulturen mit Kulturen im LDW von 16 : 8 Std. bezüglich ihrer zur 24. Std. nach Ver-

Tabelle 7. O. D. und Menge gelöster O. S. (Eichsubstanz: Glucose) in synchronen und asynchronen Scenedesmus 276 - 3a-Kulturen zur 24. Std. n. L. Standardbedingungen. Mittelwerte aus je 2 Parallelversuchen.

	LDW	DL	DL → LDW	LDW → DL
Kulturzustand	synchron	asynchron	Übergang zur Synchronie	Übergang zur Asynchronie
O.D.	0,84	1,07	0,75	1,34
gel. O.S. mg C/l	4,1	3,1	2,9	4,9
gel. O.S. mg C/g TS'	4,9	2,9	3,9	4,0

suchsbeginn erbrachten Wachstumsleistung, so stellt man in den Dauerlicht-Kulturen die höheren O. $D._{24}$-Werte fest (Tab. 7; unterstrichene Werte). Bezogen auf die Substanzproduktion je Lichtstunde erreichen Dauerlicht-Kulturen jedoch geringere Wachstumsleistungen als Synchronkulturen im LDW (vgl. auch PIRSON & LORENZEN 1966).

Die zur 24. Std. n. L. vorliegende Konzentration der gel. O. S. liegt im LDW deutlich höher als im Konstantlicht (Tab. 7). Noch mehr gefördert wird die Akkumulation der gel. O. S. im Anschluß an eine Umstellung vom LDW auf Dauerlicht. Hier führt also eine Belichtung während der normalen Dunkelphase zu einer Konzentrationssteigerung der gel. O. S. Überführt man umgekehrt DL-adaptierte Kulturen in den LDW, so ergeben sich am Ende des 1. LDW ähnlich niedrige Konzentrationen der gel. O. S. wie in DL-adaptierten Kulturen (Tab. 7). Im 2. - ohne Verdünnung anschließenden - Zyklus steigt die gel. O. S.-Konzentration dann wieder deutlich über die der DL-Kulturen an (Abb. 14).

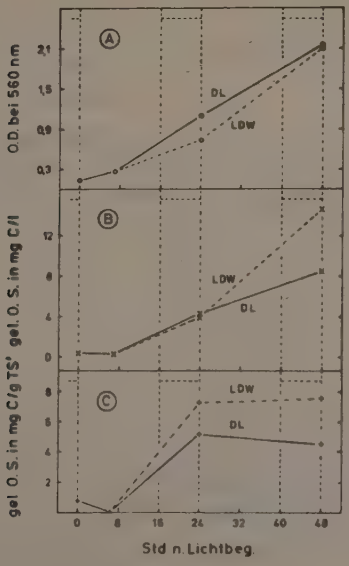


Abb. 14.
O. D. (A) und Menge gelöster O. S. (B, C; Eichsubstanz: Glucose) zur O., 7., 24. und 48. Std. n. L. in Dauerlicht (DL)- und asynchronen Wechsellichtkulturen (LDW). Die LDW-Kulturen wurden bei Versuchsbeginn mit DL-Algen angesetzt. Mittelwerte aus je 2 Parallelversuchen.

3.3.2. Ausgangsdichte

In den ersten Stunden der Lichtphase treten Konzentrationsschwankungen der gel. O. S. im Medium auf (Abb. 6; S. 29). In einer Versuchsreihe konnte gezeigt werden, daß ihre zeitliche Lage von der Ausgangsdichte $O.D._0$ abhängt (Abb. 15), und zwar erscheinen die betreffenden Maxima und Minima mit steigender $O.D._0$ zu einem immer späteren Zeitpunkt. Es ist anzunehmen, daß das verspätete Auftreten dieser Phasen in Beziehung zur verzögerten Zellentwicklung steht, die bei hoher Ausgangs-

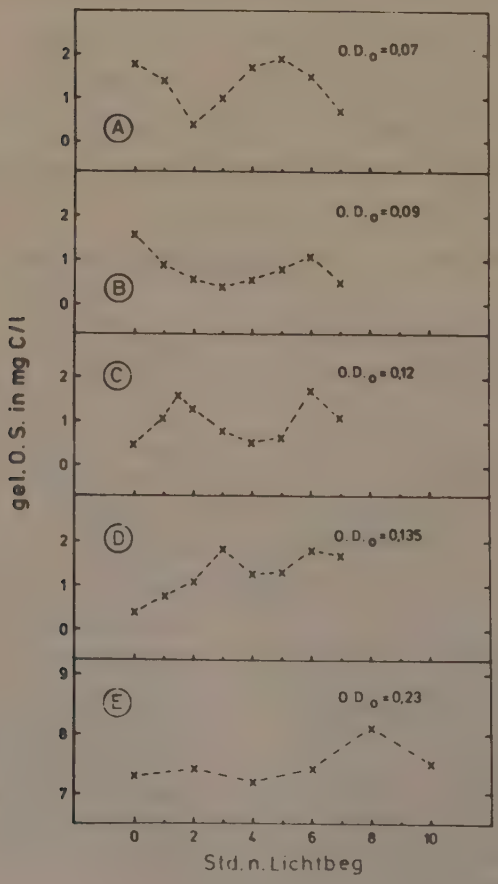


Abb. 15. Konzentrationsänderungen der gel. O. S. (Eichsubstanz: Glucose) in den ersten 7 bis 10 Std. der Lichtphase in Abhängigkeit von der Ausgangssuspensionsdichte. Die Kulturen waren über 3 LDW an die unterschiedlichen O. $D._0$ adaptiert worden. Meßwerte aus einem Einzelversuch (A) bzw. Mittelwerte aus je 2 Parallelversuchen (B - E).

Tabelle 8. Abhängigkeit der auf O. D. bezogenen Wachstumsleistung $f_{O.D.}$ und der zur 24. Std. des 1. LDW nach Versuchsbeginn vorliegenden Menge gelöster O. S. (Eichsubstanz: Glucose) von verschiedenen Ausgangsdichten (O. $D._0$). Bis auf O. $D._0$ Standardbedingungen. Mittelwerte aus je 2 Parallelversuchen.

O. $D._0$	O. $D._{24}$	$f_{O.D.}$	gel. O. S.	
			mg C/l	mg C/g TS'
0,09	1,140	9,5	6,0	5,3
0,11	0,865	7,2	4,0	4,6
0,12	0,840	7,0	4,2	5,0
0,13	0,710	5,9	3,4	4,8
0,145	0,620	5,2	2,9	4,7
0,16	0,590	4,9	2,7	4,6
0,23	0,360	3,0	4,3	12,0

dichte zu beobachten ist (vgl. die verspätet einsetzende AFS bei O.$D._0$ = 0,23; S. 27), in anderen Worten, daß die zeitliche Lage der Konzentrationsänderungen der gel. O. S. zumindest in der 1. Hälfte der Lichtphase des LDW entwicklungsabhängig ist.

Die Untersuchung der Abhängigkeit der relativen Exkretmenge von der O. $D._0$ zeigt eine annähernde Konstanz der erhaltenen Werte in einem weiten Bereich der eingestellten Ausgangsdichten (Tab. 8; die Unterschiede der TS'-bezogenen gel. O. S.-Werte sind zwischen O. $D._0$ = 0,09 und 0,16 nicht signifikant). Erst bei höheren Kulturdichten, die eine Wachstumsminderung um über 30 % gegenüber Kulturen unter Standardbedingungen bewirken, steigt die relative Exkretmenge an.

3.3.3. Temperatur

3.3.3.1. Suboptimale Temperatur

Temperaturen zwischen 30 und 33°C sind für das Wachstum von Scenedesmus 276 - 3a optimal (vgl. auch SOEDER 1971 und HEGEWALD, unveröff.). Im ersten LDW nach Senkung der Temperatur von 30 auf 25°C beträgt die Wachstumsleistung nur noch 70 bis 75 % der Kontrolle bei 30°C. Wie bei schwachen Lichtintensitäten ist auch hier (in Übereinstimmung mit ŠETLIK et al. 1972) der Entwicklungsablauf verzögert: Die AFS beginnt erst in der Dunkelperiode (Tab. 12; S. 56), und zur 24. Std. n. L. liegen noch 5 oder 6mal soviele Autosporenmutterzellen im Medium vor wie bei 30°C. Dies gilt sowohl für adaptierte wie für nicht adaptierte Kulturen. Jedoch erreichen an 25°C angepaßte Algen höhere Vermehrungsfaktoren als Kulturen der Übergangsphase (80 bis 85 % der Kulturen bei 30°C).

Am Ende des 1. LDW nach Umstellung von 30 auf 25°C wird die gleiche relative Exkretmenge gefunden wie unter Standardbedingungen (30°C), während die Konzentration der gel. O. S. bezogen auf Kulturvolumen deutlich verringert ist (Abb. 16 B, C). Wie aus Abbildung 13 B, C (S. 39) hervorgeht, erfolgt die Anhäufung der gel. O. S. nach Temperatursenkung auf 25°C vor allem während der Dunkelphase des LDW. Kulturen, die 3 Tage in 25°C vorkultiviert wurden, weisen eine geringere relative Exkretmenge auf (ca. 85 % der Kulturen bei 30°C).

3.3.3.2. Überoptimale Temperaturen

Bei Erhöhung der Temperatur kommt es zu einer massiven Wachstumshemmung (Abb. 16 A). Im ersten LDW nach Umstellung der Kulturen von 30 auf 37°C läuft die AFS nur bei 50 bis 60 % aller

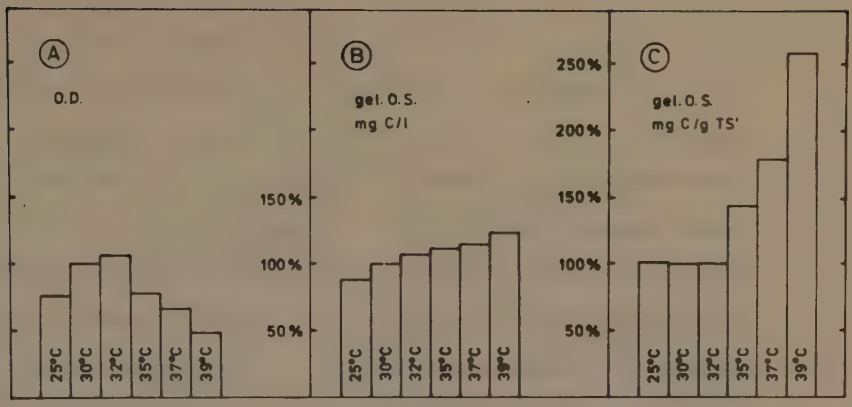


Abb. 16. Abhängigkeit der zur 24. Std. nach Versuchsbeginn vorliegenden O. D. und Menge gelöster O. S. (Eichsubstanz: Glucose) von der Temperatur. Werte in % der Standardkultur bei 30°C. Für die O. D. bedeutet 100 %: O. D. = 0,86 , für die gel. O. S.: 4,2 mg C/l Suspension bzw. 4,8 mg C/g TS'. Mittelwerte aus je 2 Parallelversuchen.

Mutterzellen vollständig ab, bei 39°C ist die Zellteilung komplett inhibiert.

Je mehr die Anzuchttemperatur das Optimum übersteigt, desto mehr steigt die Konzentration gelöster O. S. an. Die relative Exkretmenge der in 39°C überführten Kultur übertrifft den bei 30°C erhaltenen Kontrollwert um mehr als 150 % (Abb. 16 C). Auch die absoluten Exkretmengen sind deutlich gegenüber den Standardkulturen erhöht (Abb. 16 B).

3.3.4. CO_2-Versorgung

Suboptimale CO_2-Versorgung gehört nach verschiedenen Autoren zu den Bedingungen, welche bei Algen die Abgabe von Glykolat und anderen organischen Säuren stimulieren (vgl. besonders

HESS & TOLBERT 1967; CHANG & TOLBERT 1970; ROBINSON & GIBBS 1975). Da es bei Massenkulturen von Scenedesmus im Freiland leicht zu CO_2-Verknappung kommt, bzw. aus Gründen der möglichst ökonomischen CO_2-Ausnutzung suboptimale CO_2-Konzentrationen im Medium eingestellt werden (WIDENKA 1975), war es von besonderem Interesse festzustellen, welche Beziehung zwischen der Gesamtakkumulation organischer Substanz im Medium und der CO_2-Versorgung besteht.

Der CO_2-Eintrag je Kulturröhre x Std. wurde auf zweierlei Weise verändert: 1. durch Variation der Durchflußmenge zwischen 0,2 und 49 Nl Gasgemisch pro Std., 2. durch Änderung des CO_2-Gehaltes im CO_2-Luftgemisch bei konstanter Begasungsrate.

3.3.4.1. Einfluß unterschiedlicher CO_2-Eintragsraten auf Wachstum und Akkumulation gelöster O. S.

In verschiedenen Versuchsreihen wurden bei Lichtbeginn unterschiedliche Begasungsraten eingestellt (Abb. 17). Bei einem Gasdurchsatz von < 0,6 Nl/Kulturröhre x Std. liegen die Vermehrungsfaktoren nur knapp über $f_{O.D.} = 1$. Mit zunehmender Begasungsrate steigt die O. D.-Zunahme nach Art einer Sättigungskurve an und erreicht ihren Maximalwert bei etwa 50 Nl/Kulturröhre x Std. mit einem Vermehrungsfaktor um $f_{O.D.} = 9$ (Abb. 17 D).

Die höchsten Konzentrationen der gel. O. S. je Liter Kulturvolumen werden bei mittleren Begasungsraten (2 bis 7 Nl/Kulturröhre x Std.) erreicht, bei denen das Wachstum nur 55 bis 50 % der Kontrolle (16 Nl/Kulturröhre x Std.) beträgt (Abb. 17 B). Eine Erhöhung oder Reduktion der Begasungsrate führt zu verringerter Akkumulation gelöster O. S. Die maximale relative Exkretmenge liegt bei einer Begasungsrate von etwa 1 bis 3 Nl/

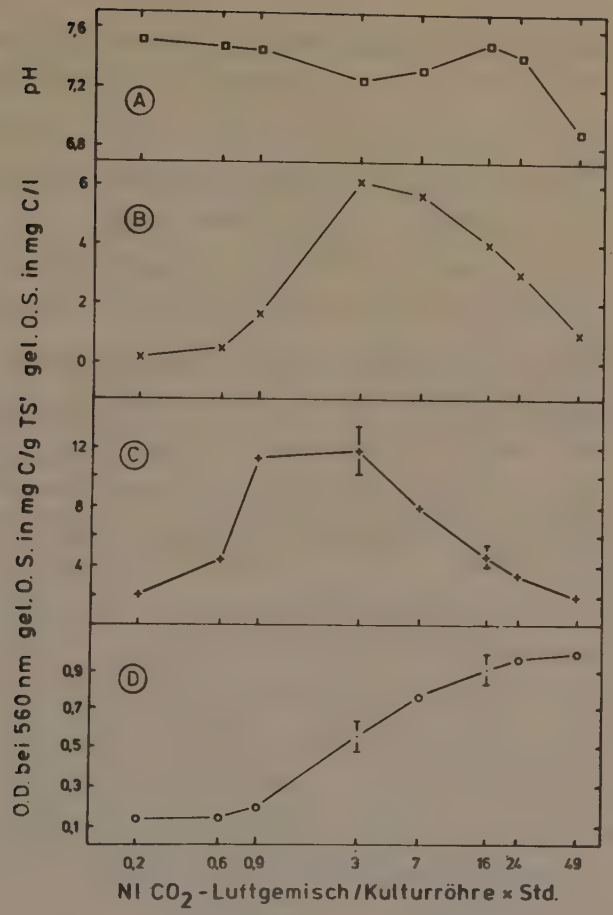


Abb. 17. Abhängigkeit des pH-Wertes (A), der Menge gelöster O. S. (B, C; Eichsubstanz: Glucose) und der O. $D._{24}$ (D) von verschiedenen Gasdurchflußraten. Halblogarithmische Auftragung der im 1. LDW nach Änderung der Begasungsrate vorliegenden 24 Std.-Werte. Meist Mittelwerte aus 2 Parallelversuchen. Für 16 (= Standard) und 3 Nl Gas/Kulturröhre x Std. wurden bei der O. D. und relativen Exkretmenge aus je 10 Versuchen Standardabweichungen und Signifikanz ermittelt. Die Unterschiede sind mit $p < 0{,}1$ % gesichert.

Kulturröhre x Std. vor. Die Wachstumsleistung ist bei dieser Begasungsrate um 2/3 vermindert und die relative Konzentration der gel. O. S. 2,5 mal so hoch wie bei den Kontrollkulturen. Kulturen, die an schwache Begasungsrate (3 Nl/Kulturröhre x Std.) adaptiert sind, unterscheiden sich hinsichtlich der zur 24. Std. n. L. vorliegenden Konzentration gelöster O. S. nicht signifikant von den entsprechenden Übergangskulturen (Tab. 12; S. 56). Die Befunde stimmen zum Teil (d. h. für einen bestimmten Bereich der CO_2-Dosierung) mit Ergebnissen überein, die NALEWAJKO (1966) bei 24 Planktonalgen fand: suboptimale CO_2-Versorgung führt zu verminderter Photosyntheserate und gleichzeitig gesteigerter Akkumulation gelöster O. S. Den

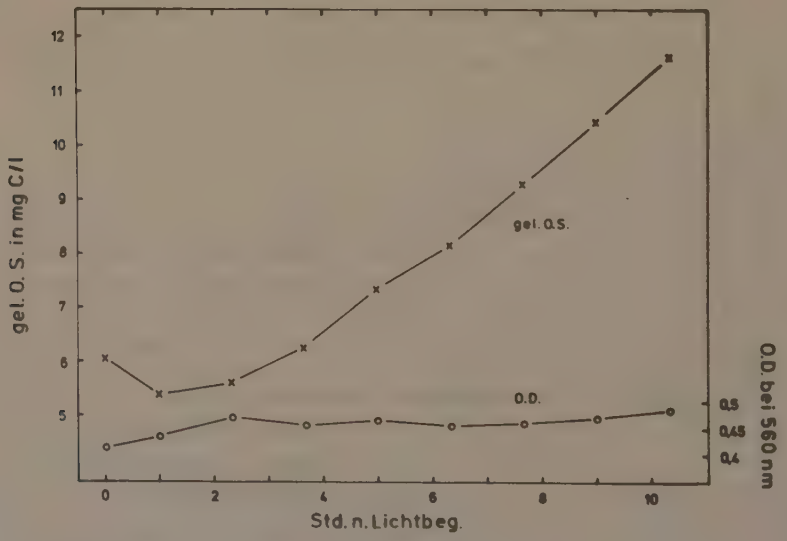


Abb. 18. Wirkung vollständigen Gasentzugs auf die O. D. und die Akkumulation gelöster O. S. im Medium von Scenedesmus 276 - 3a-Kulturen während der ersten 10 Std. n. L. im LDW. Ausgangsdichte $O. D._0$ = 0,41. Mittelwerte aus 2 Parallelversuchen.

Untersuchungen NALEWAJKO's liegt die ^{14}C-Methode zugrunde.

Die Effekte, die bei einem vollständigen CO_2-Entzug und gleichzeitig fehlender Turbulenz unmittelbar nach Lichtbeginn auftreten, sind in Abbildung 18 dargestellt. Nach einer Konzentrationsabnahme der gel. O. S. in den ersten 1,5 Std. n. L. steigt die Exkretmenge/l an und erhöht sich in den ersten 10 Std. n. L. um etwa 6 mg C/l.

3.3.4.2. Einfluß unterschiedlicher CO_2-Eintragsraten auf die Akkumulation gelöster O. S. im Zusammenhang mit der Zellentwicklung

Auf suboptimale CO_2-Versorgung (d. h. hier suboptimale Begasungsraten) reagiert Scenedesmus 276 - 3a mit einer erheblichen Verzögerung der Zellentwicklung. So beginnt die AFS bei Begasung mit < 0,6 Nl/Kulturröhre x Std. erst am Ende des 24-Std.-Zyklus, d. h. mit mehrstündiger Verspätung gegenüber den Kontrollen. Bei Begasung mit 3 Nl/Kulturröhre x Std. verzögert sich die AFS im Vergleich zur Kontrolle um etwa 2 Std. (Abb. 19 A). Bei Schwachlichtkulturen war ebenfalls eine erhebliche Verspätung der AFS festgestellt worden (S. 37), begleitet von einer gleichsinnigen Verschiebung der Konzentrationsänderungen der gel. O. S. Hier ist nun das Gegenteil der Fall: Der Hauptanstieg der Menge gelöster O. S. beginnt mindestens 3 Std. früher als unter Standardbedingungen (Abb. 20 B, C; S. 51). Auch die folgenden Peaks und Minima der Dunkelzeit, einschließlich der in der Kontrolle zu Beginn der Lichtperiode auftretenden Exkretsteigerung, sind vorgezogen (zur Interpretation dieses Befundes vgl. Abschnitt 4.3., S. 87).

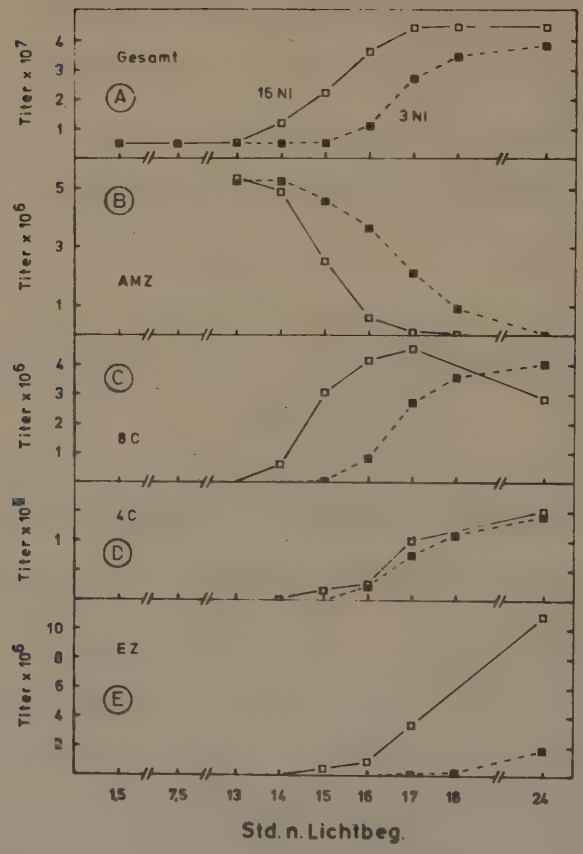


Abb. 19. Änderungen der Gesamtzellzahl (A; Gesamt) und Verlauf der Autosporenfreisetzung (B - D) zwischen der 13. und 24. Std. n. L. bei zwei verschiedenen Begasungsraten mit 1 Vol. % CO_2 in Luft (16 Nl = Standard und 3 Nl/Kulturröhre x Std.). Die Werte für 3 Nl/Kulturröhre x Std. beziehen sich auf den 1. LDW nach Änderung der Begasungsrate. (B): Abnahme der Autosporenmutterzellen je Volumeneinheit (AMZ); (C, D): Bildung 8- bzw. 4-zelliger Tochtercoenobien (8C bzw. 4C); (E): Zerfall der Coenobien in Einzelzellen (EZ). Mittelwerte aus je 2 Parallelversuchen.

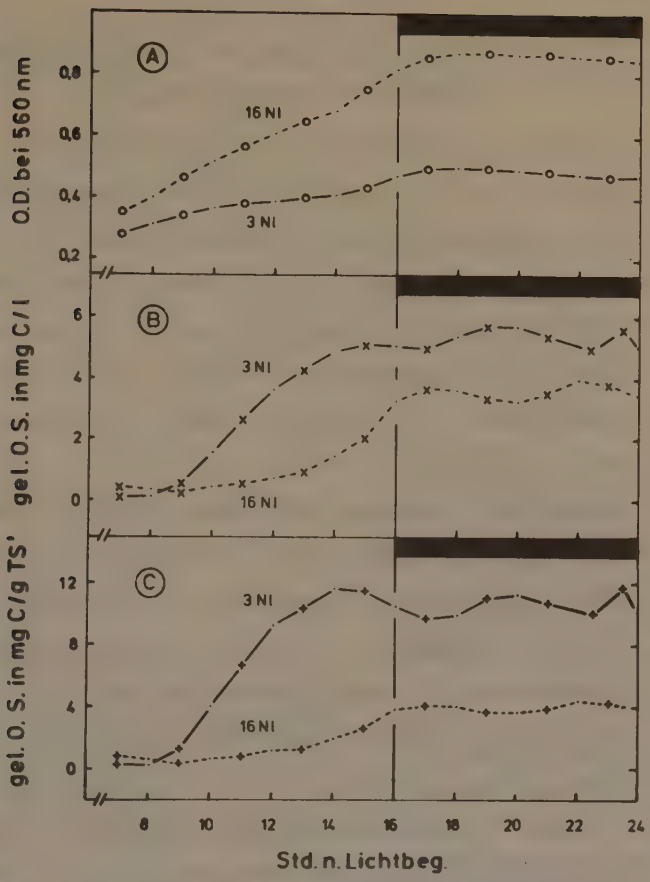


Abb. 20. Änderungen der O. D. (A) und der Menge gelöster O. S. (B, C; Eichsubstanz: Glucose) bei suboptimaler Begasungsrate (3 Nl/Kulturröhre x Std.) und unter Standardbedingungen (16 Nl/Kulturröhre x Std.) während des LDW zwischen der 7. und 24. Std. n. L. Mittelwerte aus je 2 Parallelversuchen.

3.3.4.3. Einfluß der Begasungsrate auf die chemische Zusammensetzung der gel. O. S.

Einige makroskopische und mikroskopische Beobachtungen weisen darauf hin, daß die Zellwand bei suboptimaler CO_2-Versorgung andere Oberflächeneigenschaften aufweist als unter Standardbedingungen. In den letzten 2 bis 3 Std. vor Beginn der Dunkelphase flocken die Algen in suboptimal begasten Kulturen regelmäßig aus. Die Flocken, lockere Zusammenballungen von Coenobien, erreichen Durchmesser von knapp 1 mm. Die Phase der Flockung dehnt sich maximal über 4 bis 5 Std. aus. Während dieser Zeit tendieren die Algen außerdem stark dazu, an der Wandung von Glasgefäßen zu haften. Im mikroskopischen Bild fällt ein weiterer Unterschied zu Standardkulturen auf. Während dort 30 bis 40 % der 8zelligen Tochtercoenobien während der Dunkelphase in Einzelzellen zerfallen, ist bei suboptimaler CO_2-Zufuhr der Zerfall der Tochtercoenobien stark vermindert (Abb. 19 C, E; S. 50).

Diese Charakteristika partieller CO_2-Mangelkulturen gehen einher mit einem vergleichsweise hohen Peptidanteil der gel. O. S. Das Verhältnis Kohlenhydrate : Peptide beträgt bei den gelösten extrazellulären Verbindungen mit Molekulargewichten ≥ 1500 40% : 60% (Abb. 21; unter Standardbedingungen 60% : 40%, Abb. 11; S. 34). Der Anteil organischer Verbindungen mit mittleren und höheren Molekulargewichten (> 400) an der gel. O. S. liegt in Kulturen mit reduziertem Gasdurchfluß bei ca. 70 %, es werden also rund 10 % mehr Verbindungen mit Molekulargewichten < 400 abgegeben als in Standardkulturen. Ob der leichte pH-Abfall bei mittleren Begasungsraten und maximaler Konzentration gelöster O. S./l (Abb. 17 A; S. 47) auf eine vermehrte Akkumulation organischer Säuren zurück-

geht, die ja auch in Synchronkulturen anderer Grünalgen nachgewiesen wurden (CHANG & TOLBERT 1970), wurde nicht überprüft.

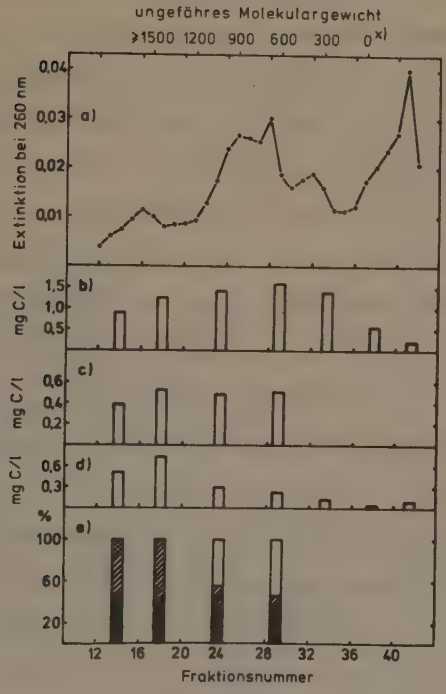


Abb. 21.
Analyse des über Sephadex G-15 fraktionierten Filtrats aus schwach begasten Kulturen (3 Nl Gas/Kulturröhre x Std.).

a) Elutionsdiagramm bei 260 nm,

b) Konzentration der gel. O. S. (Eichsubstanz: Glucose) in einzelnen Fraktionsgruppen (4 bis 7 Fraktionen wurden jeweils zu einer Fraktionsgruppe vereinigt),

c) Kohlenhydrate in mg C/l (Eichsubstanz: Glucose),

d) Peptide und freie Aminosäuren in mg C/l (die Umrechnung der Peptide in Peptid-Kohlenstoff erfolgte unter Berücksichtigung der Befunde, die GOCKE (1969) über die Aminosäure-Zusammensetzung der in Scenedesmus quadricauda-Kulturen vorliegenden extrazellulären Peptide erhob),

e) prozentualer Anteil der Peptide (schraffiert) und Kohlenhydrate (schwarz) an der gel. O. S. der jeweils entsprechenden Fraktionsgruppe.

Mittelwerte aus je 2 Parallelversuchen.

x) Bei Substanzen mit einem Molekulargewicht von $\leqslant 0$ handelt es sich um Substanzen, deren Austritt aus der Säule verzögert wird.

3.3.5. Kombination reduzierter CO_2-Begasung und Lichtintensität

Nach den ermittelten Daten steigern niedrige Lichtintensitäten (4 klux) und Begasungsraten (3 Nl/Kulturröhre x Std.) die Akkumulation gelöster O. S. auf das 2- bis 3-fache gegenüber Standardbedingungen. Die gleichzeitige Reduktion von Lichtintensität und Begasungsrate vermag die relativen Exkretmengen nur noch unwesentlich weiter zu erhöhen (Tab. 9). Die Varianzanalyse ergibt für die beiden Faktoren eine statistisch gesicherte Wechselwirkung (Tab. 10); dies gilt ebenso für die absoluten Werte der gel. O. S. Es ist daher anzunehmen, daß Licht und CO_2-Zufuhr die Akkumulation gelöster O. S. unter den betrachteten Bedingungen über einen gemeinsamen Mechanismus beeinflussen.

Bei suboptimaler Temperatur (25°C) bewirkt weder geringe Lichtintensität noch reduzierte Begasungsrate noch die Kombination beider Faktoren eine signifikante Steigerung der rela-

Tabelle 9. Wirkung schwacher Begasung kombiniert mit geringer Belichtung auf O. D. und Menge gelöster O. S. (Eichsubstanz: Glucose) bei 30°C. 24-Std.-Werte im 1. LDW nach Abweichung von den Standardbedingungen. Mittelwerte aus je 2 Parallelversuchen.

Beleuchtungsstärke (klux)	Begasung (Nl/Kulturröhre x Std.)	$O.D._{24}$	%	Gel. O. S. mg C/l	%	mg C/g TS'	%
15	16	865	100	3,25	100	3,85	100
15	3	550	64	5,1	157	9,3	242
4	16	290	34	2,95	91	10,05	262
4	3	267	31	2,75	85	10,4	270

tiven Exkretmenge (Tab. 11).

Tabelle 10. Statistische Sicherung der Wirkungen schwacher Begasung (3 Nl/Kulturröhre x Std.) und geringer Belichtung (4 klux) bzw. ihrer Wechselwirkung in bezug auf die relative Exkretmenge.

Variabilität	Freiheitsgrade	Summe der Abweichungsquadrate	Durchschnittsquadrate	F-Werte
Belichtung	1	26,645	26,645	$117,1^{+++}$
Begasung	1	16,82	16,82	$73,9^{++}$
Wechselwirkung Belichtung x Begasung	1	13,005	13,005	$57,2^{++}$
Restvarianz	4	0,91	0,228	

$^{+++}$ bzw. $^{++}$: Der F-Wert ist mit einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von $< 0,1$ % bzw. < 1 % statistisch gesichert

Tabelle 11. Wirkung schwacher Begasung kombiniert mit geringer Belichtung auf O. D. und Menge gelöster O. S. (Eichsubstanz: Glucose) bei 25°C. 24-Std.-Werte im 1. LDW nach Abweichung von den Standardbedingungen. Mittelwerte aus je 2 Parallelversuchen.

Beleuchtungsstärke (klux)	Begasung (Nl/Kulturröhre x Std.)	$O.D._{24}$	%	Gel. O. S. mg C/l	%	mg C/g TS'	%
15	16	775	100	2,8	100	3,6	100
15	3	553	71	2,1	75	3,8	106
4	16	344	44	1,25	45	3,65	101
4	3	323	42	1,3	46	3,95	110

Tabelle 12. Übersicht über den Einfluß verschiedener Außenfaktoren auf Wachstum und Akkumulation gelöster O. S. in Synchronkulturen von Scenedesmus 276 - 3a. 1. Spalte: O.D., 24 Std. n. L. gemessen, in % der unter Standardbedingungen ermittelten Werte; 3. Spalte: relative Exkretmenge (mg C/g TS') gemessen zur 24. Std. n. L. in % der Kontrolle. Die Werte hinter den Schrägstrichen gelten für adaptierte Kulturen.

	Wachstum, Entwicklung		Gel. O. S.	
	% O.D.	Beginn der AFS (Std. n. L.)	Relative Exkretmenge	Phase des Hauptanstiegs (Std. n. L.)
Standardbedingungen	100	13,5 - 14,5	100	13 - 17
Licht DL	130		59	
Licht 7 klux	51/53	15 / nach 16	200/165	nach 15
Licht 1 klux	17	24	89	
$O.D._0$ $O.D._0$ = 0,23	43	17	240	
Temperatur 25°C	70/80	nach 16	102/ 85	nach 16
Temperatur 37°C	42		180	
Begasung 3 Nl	65/60	14,5/nach 15,5	250/250	9 - 14
Begasung 0,6 Nl	18	24	100	

3.4. Die Akkumulation gelöster O. S. in Abhängigkeit vom Mineralstoffangebot

Die vorstehenden Abschnitte dieser Arbeit (3.2. und 3.3.) haben gezeigt, daß es unter Bedingungen, die eine suboptimale Wachstumsleistung ergeben, meist zu einer verstärkten Akkumulation gelöster O. S. im Medium kommt (Tab. 12; S. 56). Es soll nun untersucht werden, inwiefern dies auch für suboptimale oder überoptimale Versorgung mit verschiedenen Mineralstoffen gilt.

3.4.1. Mangan

Auf Umsetzung in Mn-freies Medium reagieren Grünalgen relativ rasch mit verminderter Photosynthese und hierdurch bedingter Verminderung der Biomasseproduktion (vgl. z. B. SOEDER et al. 1967 für Chlorella fusca). Mn-Entzug führt außerdem zu einer charakteristischen Reduktion des Kohlenhydratgehaltes der Zellen (PIRSON & BADOUR 1961; Objekt: Chlorella vulgaris).

Bei unseren Scenedesmus-Synchronkulturen kommt es nach Mn-Entzug innerhalb 24 Std. zu einer Verminderung der Wachstumsleistung um etwa 30 % gegenüber der Kontrolle (Tab. 13). Die AFS erfolgt dabei weniger vollständig als im Vollmedium.

Nach 24 Std. entspricht die Konzentration der gel. O. S. ca. 4 mg C/l im Mangelmedium, d. h. sie stimmt mit den Werten aus Kontrollkulturen weitgehend überein. Die relative Exkretmenge ist allerdings signifikant (um ca. 45 %) erhöht (Tab. 13). Nach Literaturangaben (z. B. HESS & TOLBERT 1967, MILLER et al. 1963) fehlt Algen, die unter Mn-Mangel stehen, die Fähigkeit zur Glykolatausscheidung. Wenn dies auch für Scenedesmus 276 - 3a zutreffen sollte, so müßte man annehmen, daß Glykolat

als Ausscheidungsprodukt in diesem Fall keine große Rolle spielt.

Tabelle 13. Optische Dichte, Zellzahlen und Menge gelöster O. S. (Eichsubstanz: Glucose) am Ende des 1. LDW nach Manganentzug. Die Werte stellen Mittel aus 6 Versuchen dar. In Klammern sind Standardabweichungen angegeben. Die Unterschiede der O. D. bzw. der relativen Exkretmengen und Gesamtzellzahlen sind mit $p < 0{,}1$ % bzw. $p < 1$ % statistisch gesichert. Der Unterschied zwischen den Exkretwerten je 1 Suspension ist nicht signifikant.

	Mn-Mangel	Vollmedium
$O.D._{24}$ ($\pm s$) %	0,47 ($\pm$0,04) 67	0,70 ($\pm$0,07) 100
Gesamtzellzahl/ml x 10^7 ($\pm s$) %	2,76 ($\pm$0,43) 72	3,85 ($\pm$0,39) 100
ungeteilte AMZ/ml x 10^5	9,8	4,4
gel. O. S. mg C/l ($\pm s$) % mg C/g TS' ($\pm s$) %	 3,95 ($\pm$0,7) 96 8,4 ($\pm$1,3) 145	 4,1 ($\pm$0,7) 100 5,8 ($\pm$0,8) 100

3.4.2. Magnesium, Calcium

Aus Vorversuchen ging hervor, daß eine Reduktion der Magnesiumsulfat-Dosis im Medium von 2 x 10^{-4} M auf 2 x 10^{-5} M die 24 Std. nach diesem partiellen Mineralstoffentzug gemessene Konzentration der gel. O. S. auf das 2,5-fache der Kontrollwerte steigert. Zunächst konnte weder durch Mg-Entzug noch durch Sulfat-Entzug allein der gleiche, die Akkumulation gelöster O. S. stimulierende Effekt erzielt werden wie mit

partiellem $MgSO_4$-Entzug (Abb. 22).

In Magnesium-armen oder -freien Medien wurde $MgSO_4$ äquimolar durch K_2SO_4 ersetzt. Die Depression der Wachstumsleistung auf etwa 70 % der Kontrollwerte ist von einer Hemmung der Zellentwicklung begleitet. Weniger als 10 % der Zellen haben 24 Std. n. L. Autosporen freigesetzt.

Die absolute und relative Exkretmenge sind unter Mg-Mangelbedingungen um etwa 40 bzw. 90 % erhöht (Abb. 22 B, C).

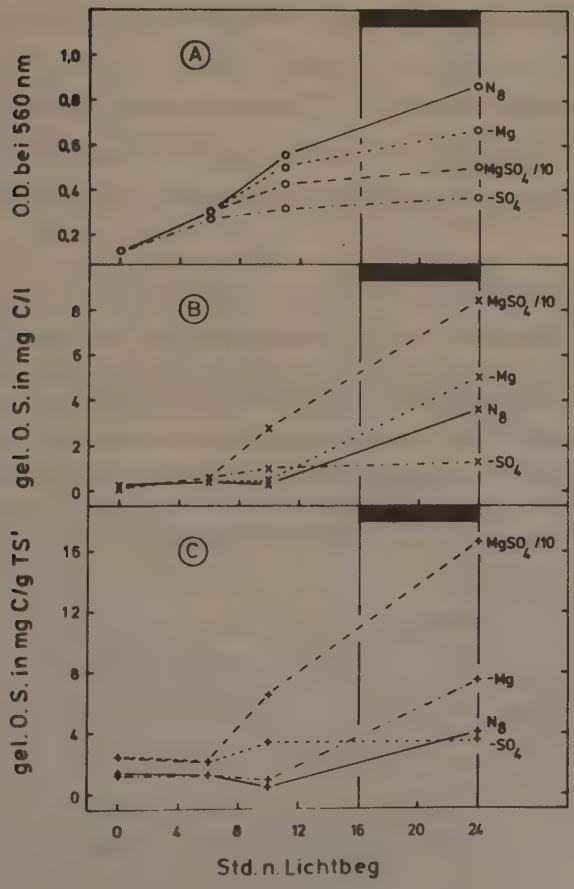


Abb. 22.
Vergleich der Wachstumsleistung (A) und Menge gelöster O. S. (Eichsubstanz: Glucose; B, C) zur 0., 6., 10. und 24. Std. n. L. bei partiellem $MgSO_4$-Entzug (2×10^{-5} M $MgSO_4$ = $MgSO_4$/10), vollständigem Mg-Entzug (- Mg) und vollständigem Sulfat-Entzug (- SO_4). Mittelwerte aus je 2 Parallelversuchen.

Aus Untersuchungen an anderen Objekten ist bekannt (MENGEL 1968, SCOTT 1943, 1944), daß erhöhte Ca-Gaben die Effekte eines Mg-Mangels verstärken. Es wurde deshalb geprüft, ob der Ca-Mg-Antagonismus auch im vorliegenden System zur Wirkung kommt. Aus Tabelle 14 (die beiden letzten Zeilen) geht hervor, daß der akkumulationsfördernde Einfluß reduzierter Mg-Dosis bei Erhöhung der Ca-Dosis eher vermindert als verstärkt wird. Ein Ca-Mg-Antagonismus ist somit für die zur Akkumulation gelöster O. S. führenden Vorgänge nicht nachweisbar.

Bei einer fünffachen Erhöhung der Ca-Konzentration im Standardmedium beobachtet man eine drastische Senkung der Konzentration gelöster O. S. (Tab. 14). Möglicherweise wird diese Reduktion der Exkretmengen durch die permeabilitätssenkende Wirkung des Ca (z. B. LÜTTGE 1969) verursacht (vgl. WETZEL 1969).

Tabelle 14. Einfluß erhöhter Calcium-Dosen und gleichzeitig verringerter $MgSO_4$-Konzentrationen auf Wachstumsleistung und Menge gelöster O. S. (Eichsubstanz: Glucose) zur 24. Std. nach Änderung der Anzuchtbedingungen. In N_8-Medium beträgt die Ca-Dosis 5,5 ppm, die $MgSO_4$-Konzentration 50 mg/l. Mittelwerte aus je 2 Parallelversuchen.

Ca-Dosis in ppm	$MgSO_4$-Dosis in mg/l	$O.D._{24}$	gel. O. S.			
			mg C/l	%	mg C/g TS'	%
5,5	50 (N_8)	840	4,0	100	4,8	100
27,3	50	790	1,4	35	1,8	38
5,5	5	580	8,3	208	14,3	298
27,3	5	585	8,0	200	13,7	285

3.4.3. Sulfat

Wenn Mg-Mangel nur zum geringen Teil als auslösendes Prinzip für die auffällige Konzentrationserhöhung der gel. O. S. nach teilweisem Magnesiumsulfatentzug in Frage kommt (Abb. 22), müßte hauptsächlich die Erniedrigung der SO_4-Konzentration im Medium für die Steigerung der Exkretmenge verantwortlich sein. Um diese Annahme zu prüfen, wurde in den folgenden Versuchen nur die Sulfatkonzentration (in Form von K_2SO_4) variiert, während Magnesium als $MgCl_2$ jeweils in voller Dosis zugesetzt wurde. Die Beziehungen zwischen der Sulfatkonzentration zu Beginn des Licht-Dunkelwechsels und der Akkumulation gelöster O. S. wurden besonders eingehend untersucht, um an diesem Beispiel einen besseren Einblick in die Bedingungen zu gewinnen, welche die Anhäufung gelöster O. S. begünstigen.

3.4.3.1. Einfluß der SO_4^{--}-Konzentration auf O. D.-Zunahme und Akkumulation gelöster O. S.

Die unter Standardbedingungen im Medium N_8 angezogene Suspension wurde bei Lichtbeginn in Nährlösungen unterschiedlicher Sulfatkonzentrationen überführt. Die nach 24 Std. vorliegende O. D. ist in beträchtlichem Maße von der $[SO_4^{--}]_0$ abhängig (Abb. 23 A). Zwischen 10^{-4} und 10^{-5} M $[SO_4^{--}]_0$ kommt es gleichzeitig mit zunehmend ausgeprägter Chlorose der Algen zu einer starken Abnahme der O. $D._{24}$, die bei $< 10^{-6}$ M nur noch unwesentlich unter ca. 60 % der bei optimaler $[SO_4^{--}]_0$ erreichten O. $D._{24}$ sinkt. Bemerkenswert sind auch die reduzierten $O.D._{24}$-Werte bei $[SO_4^{--}]_0 > 1 \times 10^{-4}$ M, die zeigen, daß nicht nur suboptimale, sondern auch überoptimale Sulfatgaben die Zuwachsleistung vermindern.

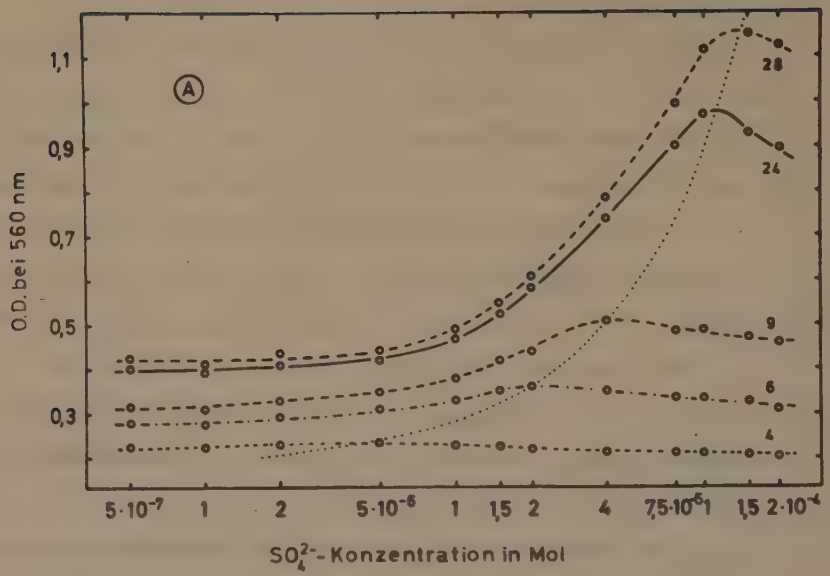


Abb. 23. (A): Abhängigkeit der O. D. zur 4., 6., 9., 24. und 28. Std. n. L. von der Ausgangs-Sulfatkonzentration. Die Optima der O. D.-Kurven der verschiedenen Entwicklungsstadien sind durch eine Punktlinie miteinander verbunden. Sulfatkonzentration in N_8: $[SO_4^{--}]_0 = 2 \times 10^{-4}$ M. Mittelwerte aus je 2 Parallelversuchen.

Das Optimum der O. D.-Zunahme verschiebt sich in Richtung abnehmender $[SO_4^{--}]_0$, je früher man im Verlauf des LDW Proben zur O. D.-Messung entnimmt (in Abb. 23 A durch eine die Optima verbindende Linie hervorgehoben). Dieser Effekt läßt darauf schließen, daß eine momentane Sulfatkonzentration von höchstens 10^{-5} M für das Wachstum von Scenedesmus 276 - 3a günstiger ist als höhere Konzentrationen. Sie reicht, als $[SO_4^{--}]_0$ geboten, jedoch nicht aus, um die Algen während des gesamten LDW ausreichend mit Sulfat zu versorgen. Deshalb kommt es nach einer von der $[SO_4^{--}]_0$ abhängigen Zeit zu Sulfatmangel, und bezogen

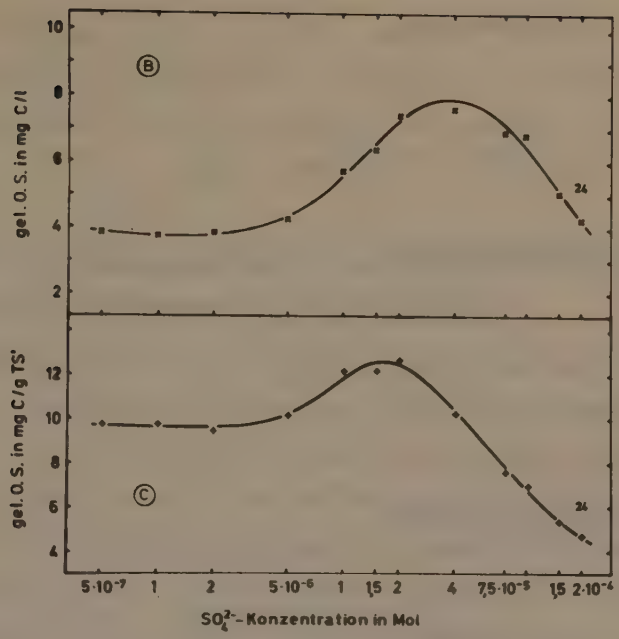


Abb. 23. (B), (C): Einfluß abgestufter Sulfatdosen auf die absolute (B) und relative (C) Exkretmenge (Eichsubstanz: Glucose) zur 24. Std. n. L. Sulfatkonzentration in N_8: $[SO_4^{--}]_0$ = 2 x 10^{-4} M. Mittelwerte aus je 2 Parallelversuchen.

auf den ganzen LDW erweist sich die $[SO_4^{--}]_0$ von 10^{-4} M als optimal.

Ebenso wie die Biomasseproduktion hängt auch die Akkumulation gelöster O. S. stark von der Sulfatkonzentration bei Lichtbeginn ab (Abb. 23 B, C). Die maximale Konzentration der 24 Std. n. L. vorliegenden gel. O. S. liegt bei ca. 4 x 10^{-5} M $[SO_4^{--}]_0$ und damit deutlich unter der für die O. D.-Zunahme optimalen Konzentration. Das Maximum der TS'-bezogenen Menge gelöster O. S. liegt bei noch geringeren $[SO_4^{--}]_0$-Werten, die mit 10^{-5}

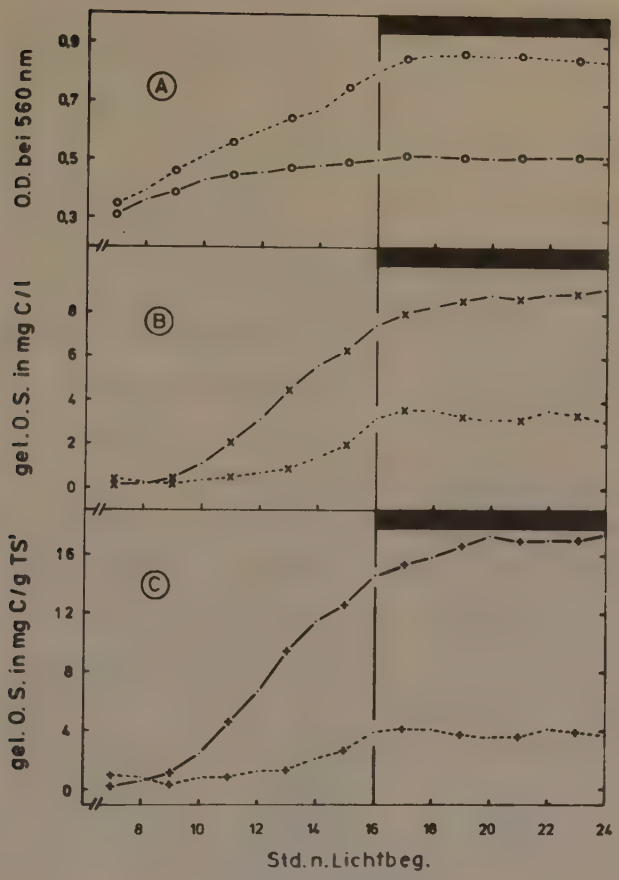
bis 2 x 10^{-5} M rund 0,05 bis 0,10 der in N_8-Medium vorliegenden Sulfatdosis entsprechen. Die relative Exkretmenge ist hier um über das Doppelte gegenüber dem Vergleichswert aus Kontrollen in N_8-Medium erhöht (Abb. 23 C).

3.4.3.2. Einfluß des Sulfatmangels auf die Akkumulation gelöster O. S. im Zusammenhang mit der Zellentwicklung

Die durch Sulfatmangel verursachte Wachstumsdepression äußert sich auch in der mehr oder minder unvollständigen AFS. Nach SCHIFF 1962 verläuft die Zellentwicklung von Grünalgen nach Sulfatentzug nur bis zur 1. Mitose normal und kommt dann zum Stillstand, da S-haltige Peptid-Nucleotide bei der Zellteilung (Cytokinese) eine wichtige Rolle spielen.

Bei suboptimaler $[SO_4^{--}]_0$ sind bei Scenedesmus 276 - 3a die ersten Teilungsstadien (1. Cytokinese) etwa zur gleichen Zeit oder noch früher (10 bis 11 Std. n. L.) zu erkennen als bei den Kontrollen. Die AFS wird jedoch lange hinausgezögert, so daß frühestens mit Dunkelbeginn die ersten Tochtercoenobien freigesetzt werden.

Wie bei CO_2-Mangelkulturen wird die Lage der Akkumulationsphasen gelöster O. S. nicht gleichsinnig mit der AFS verschoben. Im Gegenteil beginnt die Konzentration gelöster O. S. während der Zellentwicklung schon nach der 9. Std. n. L., also 3 bis 4 Std. früher als normal, steil anzusteigen (Abb. 24 B, C).



---- Kontrolle —— 1,5 x 10^{-5} M $[SO_4^{--}]_0$

Abb. 24. Zunahme der O. D. (A) und Änderungen der Menge gelöster O. S. (Eichsubstanz: Glucose; B, C) bei geringer $MgSO_4$-Konzentration ($[SO_4^{--}]_0$ = 1,5 x 10^{-5} M) im Bereich der 7. bis 24. Std. n. L. des LDW. Mittelwerte aus je 2 Parallelversuchen.

Tabelle 15. Einfluß partiellen Sulfatentzugs ($[SO_4^{--}]_0$ = 1,5 x 10^{-5} M) auf Wachstumsleistung, Konzentration der gel. O. S. (Eichstubstanz: Glucose) und chemische Zusammensetzung der Biomasse zur 24. Std. n. L. in Röhren- und Kippschwingungskulturen. Angaben in Originalmesswerten und % der Kontrollwerte ($[SO_4^{--}]_0$ = 2 x 10^{-4} M). Bei $[SO_4^{--}]_0$ = 1,5 x 10^{-5} M erreicht die relative Exkretmenge ihren maximalen Wert (vgl. Abb. 23 C). Mittelwerte aus je 2 Parallelversuchen.

	Kippschwingungskultur			Röhrenkultur		
	Kontrolle	SO_4-Mangel	%	Kontrolle	SO_4-Mangel	%
O.D.	665	445	67	920	550	60
TS	716	494	69	1030	650	63
gel. O.S. in mg C/l	2,0	3,3	165	3,85	5,4	140
gel. O.S. in mg C/g TS	2,8	6,2	221	4,2	9,8	233
Chlorophyll in mg/g TS	17,5	7,8	45	16,5	6,8	41
Stickstoff in mg/g TS	82	43,7	53	94	52	55
Rohprotein in mg/g TS	511	273	53	589	325	55
Kohlenhydrat in mg/g TS	118	376	320	90	272	300
Lipide in mg/g TS	242	276	114	156	230	147
Asche in mg/g TS	95	136	143	124	170	136

3.4.3.3. Produktionskinetik einiger Biomassekomponenten in Sulfatmangel-Kulturen

Partieller SO_4-Entzug gehört zu denjenigen hier untersuchten Bedingungen, die die Akkumulation gelöster O. S. am stärksten stimulieren. In der Erwartung, daß zwischen der graduellen Manifestierung des Mangelzustandes und der gesteigerten Akkumulation gelöster O. S. ein Zusammenhang besteht, wurde die Produktion quantitativ wichtiger Biomassekomponenten bei stark suboptimaler SO_4-Ausgangskonzentration im Verlauf des LDW eingehender untersucht.

Tabelle 15 vermittelt einen Überblick über die 24 Std. nach Überführung in eine Nährlösung mit suboptimalem SO_4-Gehalt erfaßten Effekte des Sulfatmangels. Diese Effekte bestehen in reduzierter Substanzproduktion und vermindertem Chlorophyll- sowie Proteingehalt. Dagegen steigt der Gehalt der Zellen an Lipiden und Aschebestandteilen an. Besonders aber reichern sich größere Mengen Kohlenhydrate an (dreifach höhere Werte als in der Kontrolle).

Einzelheiten zur Wirkung des partiellen SO_4-Entzugs auf Synchronkulturen gibt Abbildung 25 wieder. Etwa 8 Std. nach partiellem Sulfatentzug bleiben die Trockensubstanzproduktion und die O. D.-Zunahme deutlich hinter den Kontrollwerten zurück (Abb. 25 A, B). Die Chlorophyllsynthese kommt nach der 6. Std. n. L. zum Stillstand (Abb. 25 E). Der Chlorophyllgehalt bezogen auf TS fällt auf Grund der weiteren Zunahme der TS entsprechend ab (Abb. 25 F) und steigt auch während der Dunkelphase des LDW kaum wieder an. Die resultierende Chlorose ist auch visuell klar zu erkennen. Bereits vor der 6. Std. n. L. bedingt der partielle Sulfatentzug eine Blockierung des N-Einbaues, d. h. der Rohproteinproduktion (Abb. 25 G) und eine

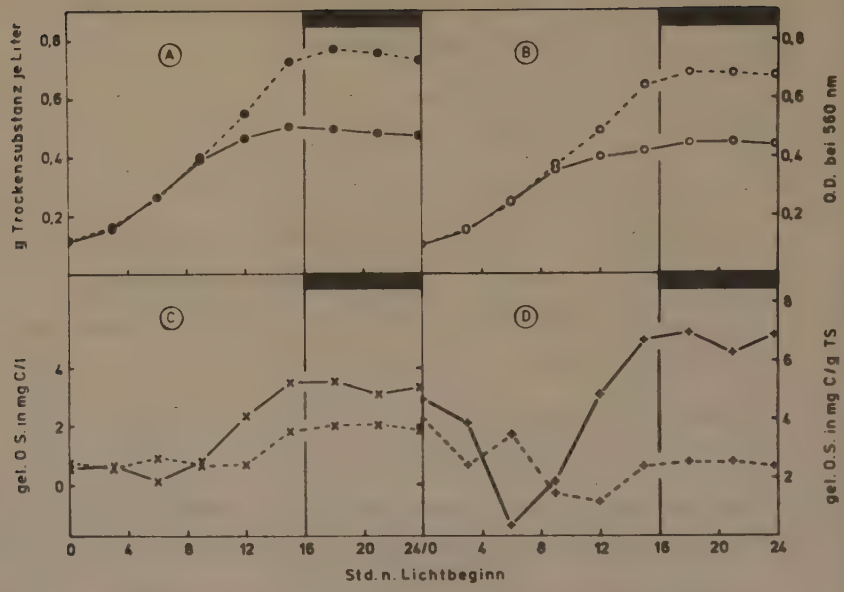
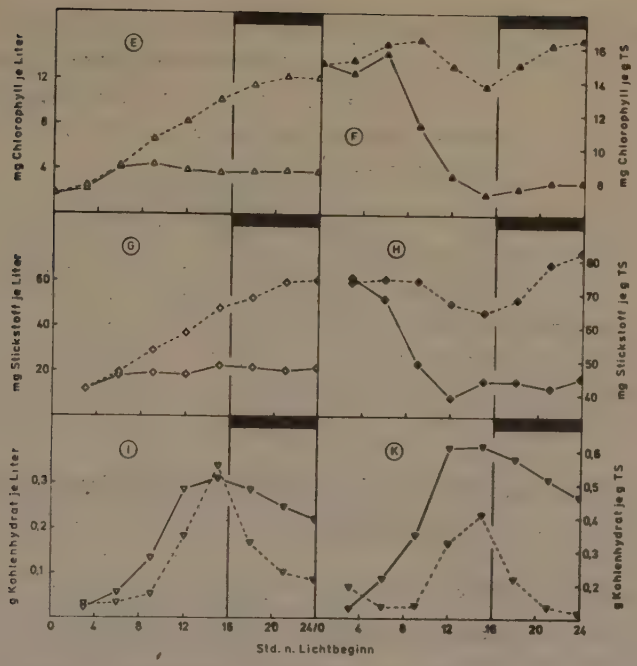


Abb. 25. (A - D): Wirkung partiellen Sulfat-Entzugs ($[SO_4^{--}]_0$ = 1,5 x 10^{-5} M) auf den Verlauf der TS- (A) und O. D.-Kurve (D) sowie auf die Änderung der Mengen gelöster O. S. (Eichsubstanz: Glucose; C, D) während des LDW in Kippschwingungskulturen. Anzuchtbedingungen s. S. 9. Mittelwerte aus 2 Versuchen.

übernormale Zunahme der Kohlenhydrate (Abb. 25 I). Infolgedessen kommt es bereits wenige Std. nach Versuchsbeginn zu einem Abfall des Rohproteingehaltes (Abb. 25 H) und einem Anstieg des Kohlenhydratgehaltes (Abb. 25 K). Der charakteristische Anstieg der auf TS bezogenen Rohproteinkonzentration, der normalerweise auf die Dunkelphase beschränkt ist, beginnt in den limitierten Kulturen bereits kurz nach der 12. Std. n. L.; er ist zwar nur schwach ausgeprägt, aber reproduzierbar



---- Kontrolle —— Mangelkultur

Abb. 25. (E - K): Wirkung partiellen Sulfat-Entzugs ($[SO_4^{--}]_0$ = 1,5 x 10^{-5} M) auf die Chlorophyll- (E, F), Stickstoff- (G, H) und Kohlenhydratsynthese (I, K) während des LDW in Kippschwingungskulturen. Mittelwerte aus 2 Versuchen. Die auf die Volumeneinheit der Suspension bezogenen Werte entsprechen mindestens bis zur 13. Std. n. L. den Gehalten/Zelle, da die Zellzahl 0 bis 13 Std. n. L. konstant bleibt.

(Abb. 25 H). Gleichzeitige Messungen des Stickstoffs und partikulären Kohlenstoffs zur 24. Std. ergaben für Mangelkulturen einen C/N-Quotienten, der etwa doppelt so hoch ist wie unter Standardbedingungen (Tab. 16).

Tabelle 16. Abhängigkeit des C- und N-Gehalts von Scenedesmus 276 - 3a von verminderter Sulfatkonzentration ($[SO_4^{--}]_0$ = 1,5 x 10^{-5} M) zur 24. Std. n. L. Die Werte wurden vom Mikroanalytischen Laboratorium (Mülheim/Ruhr) ermittelt.

	C mg/g TS	N mg/g TS	C/N
N_8-Medium	530	96	5,5
1,5 x 10^{-5} M SO_4^{2-}	482	47	10,2

3.4.3.4. Einfluß des Sulfatmangels auf die chemische Zusammensetzung der gel. O. S.

Im Sulfatmangelmedium ($[SO_4^{--}]_0$ = 1,5 x 10^{-5} M) wird ein im Vergleich zu Standardbedingungen großer Anteil an Verbindungen mit "niedrigem" Molekulargewicht (< 400) im Medium akkumuliert (Abb. 26 B). Dies wäre vielleicht eine Erklärung für das gute Bakterienwachstum in unsteril gehaltenen Sulfatmangelkulturen (s. S.13). Gleichzeitig mit dem erhöhten Kohlenhydratgehalt der Zellen (Abb. 25 K) erfolgt in den Scenedesmuskulturen eine vermehrte extrazelluläre Akkumulation an Kohlenhydraten, zumindest bei den Verbindungen mit Molekulargewichten > 400 (3,4 mg C/l gegenüber 2,7 mg C/l bei Kulturen unter Standardbedingungen; vgl. Abb. 26 c mit Abb. 11 c, S. 34). Auch werden relativ große Mengen peptidartiger Substanzen im Medium akkumuliert (Abb. 26 D), so daß sich die prozentualen Anteile der Kohlenhydrate und peptidartigen Verbindungen an der Gesamtsubstanz nicht wesentlich im Vergleich zu Standardkulturen ändern (Abb. 26 E). Die Ursache der erhöhten Abgabe peptidartiger Verbindungen und/oder Aminosäuren könnte möglicherweise darin liegen, daß produzierte Proteinvorstufen wegen des Fehlens

S-haltiger Aminosäuren nicht zu Protein synthetisiert werden können, so daß es schließlich zu einem Überschuß dieser Vorstufen kommt.

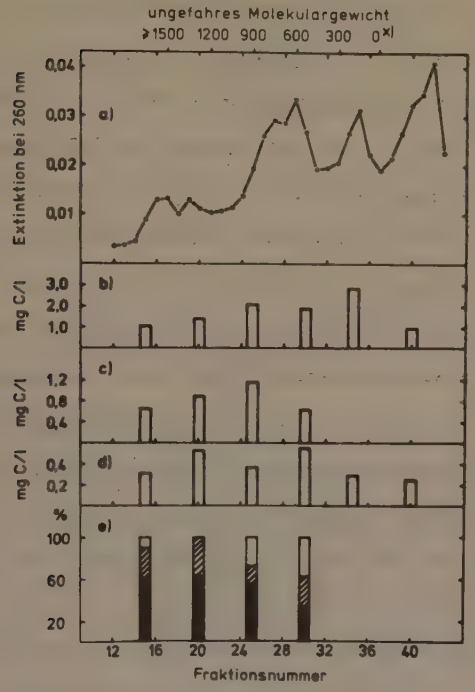


Abb. 26.
Analyse des über Sephadex G-15 fraktionierten Filtrats aus Kulturen mit partiellem Sulfat-Entzug ($[SO_4^{--}]_0$ = 1,5 x 10^{-5} M).

a) Elutionsdiagramm bei 260 nm,

b) Konzentration der gel. O. S. (Eichsubstanz: Glucose) in einzelnen Fraktionsgruppen (4 bis 7 Fraktionen wurden jeweils zu einer Fraktionsgruppe vereinigt),

c) Kohlenhydrate in mg C/l (Eichsubstanz: Glucose),

d) Peptide und freie Aminosäuren in mg C/l (die Umrechnung der Peptide in Peptid-Kohlenstoff erfolgte unter Berücksichtigung der Befunde, die GOCKE (1969) über die Aminosäure-Zusammensetzung der in Scenedesmus quadricauda-Kulturen vorliegenden extrazellulären Peptide erhob),

e) prozentualer Anteil der Peptide (schraffiert) und Kohlenhydrate (schwarz) an der gel. O. S. der jeweils entsprechenden Fraktionsgruppe.

Mittelwerte aus je 2 Parallelversuchen.

x) Bei Substanzen mit einem Molekulargewicht von ≤ 0 handelt es sich um Substanzen, deren Austritt aus der Säule verzögert wird.

3.4.4. Phosphat

Überführt man Scenedesmus 276 - 3a in phosphatfreies Medium, so wird im 1. LDW eine mindestens so hohe Enddichte der Suspension ($O.D._{24}$) erreicht wie im kompletten Medium (Abb. 27 A: -P; vgl. SOEDER et al. 1967 und SOEDER 1971 für Chlorella), da normal angezogene Zellen über genügende P-Reserven verfügen. Dies ist nicht oder nicht allein auf mixotrophe Nutzung des als Puffer verwendeten Glycylglycins (5 mM) zurückzuführen, da ungepufferte Medien ohne Glycylglycin gleiche Resultate ergaben. Die relative Exkretmenge ist im phosphatfreien Medium am Ende des LDW etwas geringer als in N_8 (Abb. 27 C : -P). Im zweiten 24-Std.-Zyklus bedingt P-Entzug dann eine Wachstumsminderung von knapp 50 % (Abb. 27 A : -P → -P). Das mikroskopische Bild läßt eine weitgehende Teilungshemmung erkennen: höchstens 10 % der Ausgangszellen haben Autosporen entlassen. Die relative Exkretmenge ist in diesen Mangelkulturen unwesentlich erhöht (Abb. 27 C : -P → -P).

Überimpft man Scenedesmus nach zweitägiger Vorkultur in P-Mangelmedium wieder in N_8-Nährlösung, so erfolgt eine sehr zögernde Regeneration (Abb. 27 A : -P → -P → N_8; vgl. auch KYLIN 1964 für Scenedesmus sp.). Selbst nach 2 Zyklen im Vollmedium erreicht die O. D.-Zunahme noch nicht den Normalwert (Abb. 27 A : -P → -P → N_8 → N_8). Die Algen reagieren auf die Rückführung in Komplettmedium mit einer um 50 bis 70 % über den Kontrollwerten liegenden Akkumulation gelöster O. S. (Abb. 27 C).

Um die Abhängigkeit der O. D.-Zunahme und der Akkumulation gelöster O. S. von der P-Dosis besser verfolgen zu können, wurde Scenedesmus 276 - 3a nach eintägiger Vorkultur in P-freier

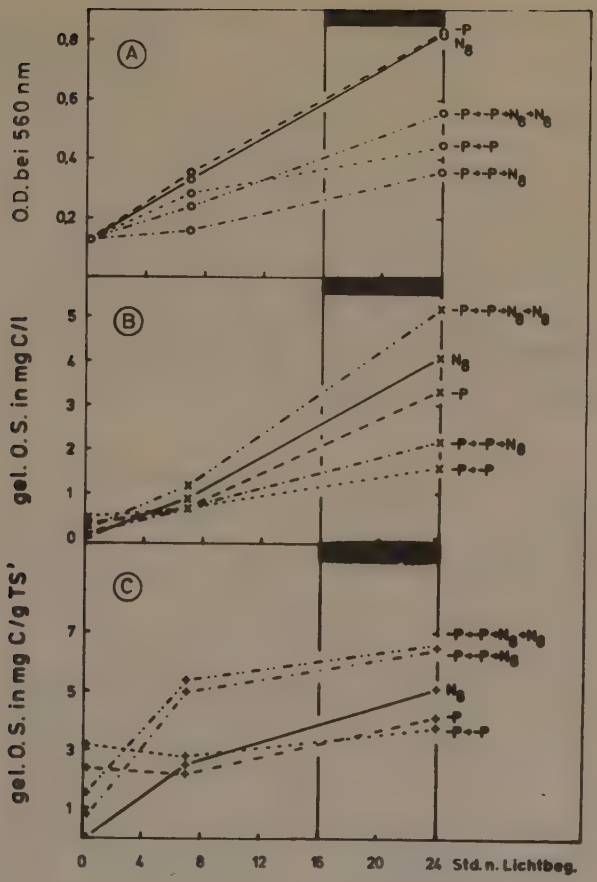


Abb. 27. Einfluß von Phosphat-Mangel auf O. D.-Zunahme (A) und Menge gelöster O. S. (Eichsubstanz: Glucose; B, C) zur 7. und 24. Std. n. L. Folgende Bedingungen wurden untersucht: 1. erster LDW in P-Mangelmedium (-P); 2. erster und zweiter LDW in P-Mangelmedium (-P → -P); 3. erster und zweiter LDW in P-Mangelmedium, darauf Überführung in N_8 (-P → -P → N_8); 4. gleiche Behandlung wie in 3. und nochmaliges Überimpfen in N_8 im vierten LDW (-P → -P → N_8 → N_8). Mittelwerte aus je 2 Parallelversuchen.

Medium bei Lichtbeginn in Nährlösungen abgestuften P-Gehalts zwischen 6 x 10^{-6} und 6 x 10^{-3} M PO_4^{3-} kultiviert (6 x 10^{-3} M entspricht der Konzentration im Vollmedium). Die Vorkultur im P-freien Medium ist notwendig, um bei der Überführung in Medien mit geringem P-Gehalt Effekte zu erzielen. Die Algen erreichen nun die maximale O. D.$_{24}$ bzw. Zelldichte bei 1 bis 3 x 10^{-4} M PO_4^{3-} (Abb. 28 A und Abb. 29 A). Höhere oder niedrigere P-Dosen vermindern den Zuwachs. Wie aus Abbildung 28 B zu ersehen, ist der Anteil der Ausgangszellen, die keine Autosporen freisetzen,

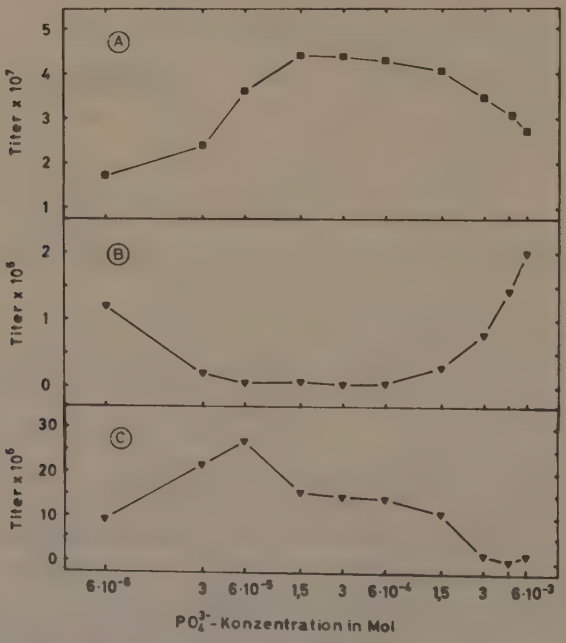


Abb. 28. Gesamtzellzahl (A), Zahl der ungeteilten Ausgangszellen (B) sowie Zahl der Einzelzellen (C), jeweils je ml, in Abhängigkeit von der Phosphatausgangskonzentration nach 24 Std. Die Kulturen waren über einen LDW in P-freiem Medium vorkultiviert worden. Mittelwerte aus 2 Parallelversuchen.

bei Konzentrationen unterhalb 3 x 10^{-5} und oberhalb 1,5 x 10^{-3} M PO_4^{3-} vermehrt.

Die in Abbildung 29 als Extreme gewählten produktionsmindernden P-Dosen ergaben 24 Std. n. L. um 60 bis 70% erhöhte relative Exkretmengen (Abb. 29 C). Dieser Effekt ist bei überoptimalem P-Angebot stärker ausgeprägt als bei suboptimalem P-Angebot (Abb. 29 B, C). Die geringste Akkumulation gelöster O. S. liegt bei mittleren PO_4-Konzentrationen vor, bei denen die höchsten Zuwachsleistungen erzielt werden.

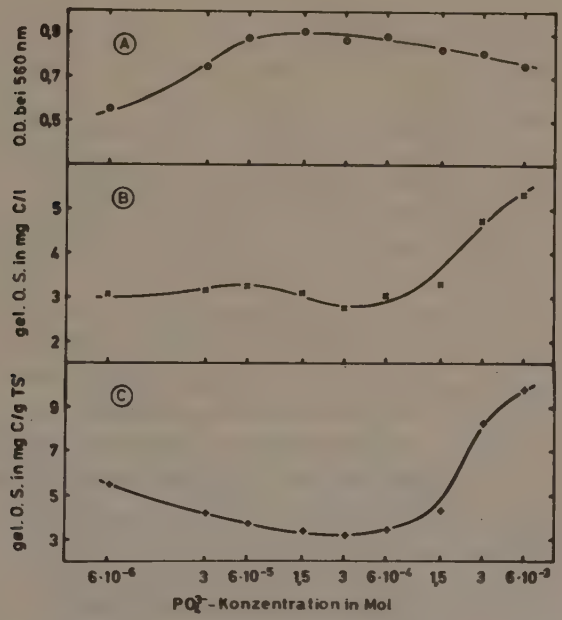


Abb. 29. Einfluß abgestufter Phosphatdosen $[PO_4^{3-}]_0$ auf O. D. und Menge gelöster O. S. (Eichsubstanz: Glucose; B, C). 24-Std.-Werte. Die Algen wurden vor Versuchsbeginn über einen LDW in P-freiem Medium vorkultiviert. Mittelwerte aus 2 Parallelversuchen.

3.4.5. Nitrat, Harnstoff

Für die Nitrat-Mangel-Versuche wurden die Algen 2 bis 3 Tage unter partiellem N-Mangel vorkultiviert, und zwar jeweils bei den in Tabelle 17 genannten $[NO_3^-]_0$-Werten. Mit abnehmender Dosis im Bereich 10^{-3} bis 2×10^{-4} M NO_3^- sinkt die 24 Std. n. L. erreichte Enddichte, und der Synchronisationsgrad vermindert sich (Tab. 17). Die Konzentration der gel. O. S. liegt bei $[NO_3^-]_0 = 2 \times 10^{-4}$ M niedriger als in N_8, bei den höheren Konzentrationen entspricht sie etwa der Kontrolle (Tab. 17). Da in N-Mangelmedien die Proteinsynthese unterdrückt wird und ein großer Teil der Energie zunächst der Kohlenhydrat-Produktion zufließt (vgl. FOGG 1966), war damit gerechnet worden, in den Kulturen erhöhte Exkretmengen zu finden. Eine hohe Ausscheidung von Polysacchariden wurde von MARKER (1965) bei Flagellaten unter N-limitierten Bedingungen nachgewiesen; er führte sie allerdings auf Autolyseprodukte ge-

Tabelle 17. Einfluß verschiedener Nitratkonzentrationen und von Harnstoff auf O. D., prozentualen Anteil der AMZ an der Gesamtzellzahl und Menge der gel. O. S. (Eichsubstanz: Glucose). 24-Std.-Werte. Mittelwerte aus je 2 Parallelversuchen.

	$O.D._{24}$	%	AMZ (%)	gel. O.S. mg C/l	%	mg C/g TS'	%
NO_3 10^{-3} M	479	57	1	1,85	54	3,9	95
NO_3 5×10^{-4} M	328	39	48	1,40	41	4,2	102
NO_3 2×10^{-4} M	260	31	90	0,64	19	2,45	60
Harnstoff 3×10^{-3} M	925	110	0	2,95	86	3,2	78

schädigter Zellen zurück. Es ist nicht auszuschließen, daß eine vermehrte Ausscheidung nur bei anderen als den untersuchten NO_3^--Konzentrationen auftritt.

Ersatz des Nitrats als N-Quelle durch Harnstoff (3×10^{-3} M) ergibt eine leichte Zunahme der Enddichte (O. $D._{24}$) und verminderte Konzentration der gel. O. S. (Tab. 17).

3.4.6. Überoptimale Nährstoffkonzentrationen

Die Hemmwirkung überoptimaler Nährsalzkonzentrationen ist bei Grünalgen von verschiedenen Autoren untersucht (z. B. SOEDER et al. 1967) und im Rahmen dieser Arbeit bereits für Sulfat (Abb. 23 A) und Phosphat (Abb. 29 A), allerdings nicht an adaptierten Kulturen, beschrieben worden. Sie kommt sehr deutlich zum Ausdruck, wenn man Scenedesmus 276 - 3a bei Lichtbeginn in $N_8 \times 10$ (zehnfach erhöhte Makroelementkonzentrationen, Spurenelementdosis normal) überführt (Tab. 18). Entsprechend den Erfahrungen mit Chlorella (SOEDER et al. 1967) kommt es im LDW nach Umsetzung von Scenedesmus 276 - 3a in

Tabelle 18. Wirkung 10-fach erhöhter Nährstoffkonzentrationen ($N_8 \times 10$) und der Rückführung in normales Medium ($N_8 \times 10 \rightarrow N_8$) auf Wachstumsleistung und Menge gelöster O. S. (Eichsubstanz: Glucose) zur 24. Std. n. L. Mittelwerte aus je 2 Parallelversuchen.

	O.$D._{24}$	%	gel. O. S. mg C/l	%	mg C/g TS'	%
$N_8 \times 10$	380	44	11,9	410	27	800
$N_8 \times 10 \rightarrow N_8$	277	33	4,2	145	15,1	445

Medium N_8 x 10 nicht zur Zellteilung.

Die Konzentration gelöster O. S. ist gegenüber der Kontrolle um das Achtfache erhöht (Tab. 18). Nach Umrechnung der Kohlenstoffwerte in organische Substanz (vgl. FORSBERG & TAUBE 1967) ergibt sich, daß in N_8 x 10-Kulturen 24 Std. n. L. ca. 8 % der organischen Gesamtsubstanz extrazellulär vorliegen. Überimpft man die Algen nach eintägiger Kultur in N_8 x 10 wieder in Normalmedium, so normalisiert sich der Zuwachs im 1. LDW im Gegensatz zu Chlorella fusca (SOEDER 1967) noch nicht (Tab. 18). Lediglich die Konzentration gelöster O. S. im Medium ist nach 24 Std. deutlich reduziert (Tab. 18).

Die bemerkenswerte Konzentrationserhöhung der gel. O. S. nach Umsetzung in N_8 x 10 ist ebenso wie die dadurch ausgelöste Zuwachsminderung im wesentlichen nicht als Folge der allgemein erhöhten Ionenkonzentration, d. h. als osmotischer Effekt zu betrachten. Vielmehr beruht sie hauptsächlich auf dem Einfluß hoher PO_4^{3-}-Dosen. Das geht aus einer Versuchsserie hervor, in der die Wirkung einzelner zehnfach konzentrierter Mineralsalze in getrennten Versuchen ermittelt wurde (Abb. 30). Nur bei zehnfach über den Normalwert erhöhter Phosphatkonzentration erreichen die Zuwachsminderung und die Konzentration gelöster O. S. Werte, die an die in N_8 x 10-Medium gemessenen heranreichen. Dagegen beeinflussen hohe Nitrat- und Sulfat-Dosen die O. D.-Zunahme und relative Exkretmenge nur schwach, und in Übereinstimmung mit Abbildung 23 B, C (S. 63) verminderte eine überoptimale Sulfatkonzentration auch in Kombination mit zehnfach erhöhter Nitrat-Dosis die Akkumulation gelöster O. S. im Medium (Abb. 30 D).

In der gel. O. S., die in N_8 x 10-Medium auftritt, ist das Verhältnis Kohlenhydrate : Peptide + Aminosäuren auffallend

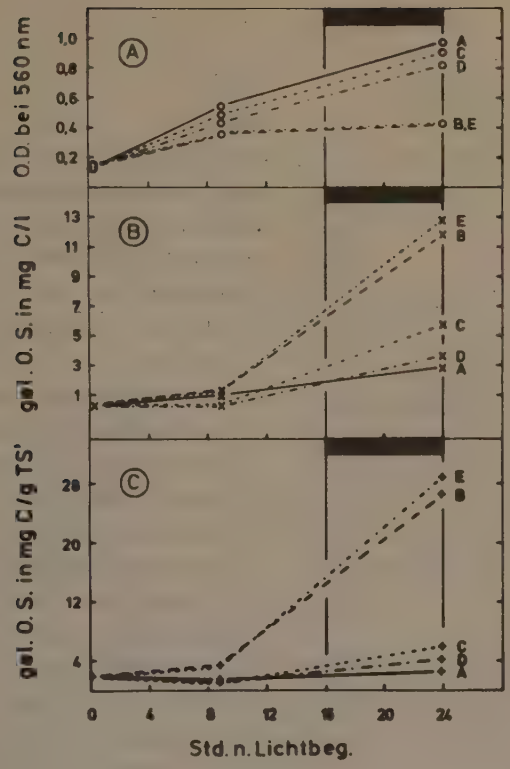


Abb. 30.
Wirkung stark überoptimaler Salzkonzentrationen auf die O. D.-Zunahme (A) und die Menge gelöster O. S. (Eichsubstanz: Glucose; B, C) zur 9. und 24. Std. n. L. Mittelwerte aus je 2 Parallelversuchen.

A: N_8 B: N_8 x 10
C: N x 10; S x 1; P x 1
D: N x 10; S x 10; P x 1
E: N x 10; S x 1; P x 10

stark zugunsten der Kohlenhydrate verschoben: Etwa 80 % der gel. O. S. liegen in den Verbindungen mit Molekulargewichten > 400 als Kohlenhydrate und nur etwa 10 % als Peptide vor (Abb. 31 e). Dabei ist die absolute Peptidmenge etwa gleich hoch wie im Medium der Standardkulturen (Abb. 31 d).

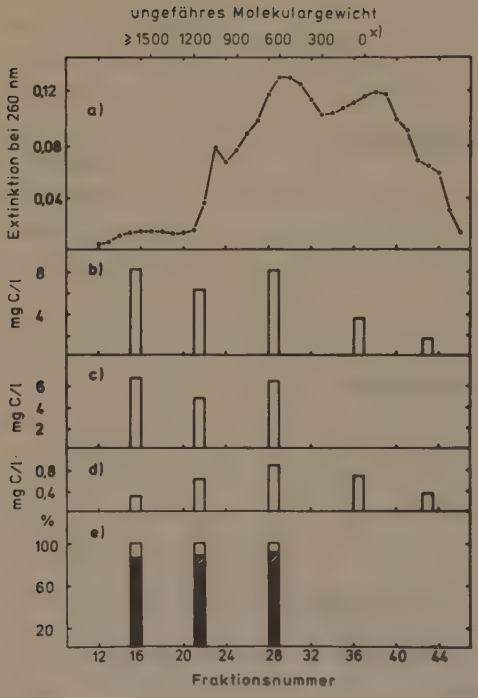


Abb. 31.
Analyse des über Sephadex G-15 fraktionierten Filtrats aus Kulturen mit zehnfach erhöhter Nährsalzkonzentration (N_8 x 10).

a) Elutionsdiagramm bei 260 nm,

b) Konzentration der gel. O. S. (Eichsubstanz: Glucose) in einzelnen Fraktionsgruppen (4 bis 7 Fraktionen wurden jeweils zu einer Fraktionsgruppe vereinigt),

c) Kohlenhydrate in mg C/l (Eichsubstanz: Glucose),

d) Peptide und freie Aminosäuren in mg C/l (die Umrechnung der Peptide in Peptid-Kohlenstoff erfolgte unter Berücksichtigung der Befunde, die GOCKE (1969) über die Aminosäure-Zusammensetzung der in Scenedesmus quadricauda-Kulturen vorliegenden extrazellulären Peptide erhob),

e) prozentualer Anteil der Peptide (schraffiert) und Kohlenhydrate (schwarz) an der gel. O. S. der jeweils entsprechenden Fraktionsgruppe.

Mittelwerte aus je 2 Parallelversuchen.

x) Bei Substanzen mit einem Molekulargewicht von ⩽ 0 handelt es sich um Substanzen, deren Austritt aus der Säule verzögert wird.

Tabelle 19. Übersicht über den Einfluß sub- und superoptimaler Nährstoffkonzentrationen auf Wachstum und Akkumulation gelöster O. S. in Synchronkulturen von Scenedesmus 276 -3a. 1. Spalte: O. D., 24 Std. n. L. gemessen, in % der unter Standardbedingungen ermittelten Werte; 3. Spalte: relative Exkretmenge (mg C/g TS') gemessen zur 24. Std. n. L. in % der Kontrolle.

	Wachstum, Entwicklung		Gel. O. S.	
	% O.D.	Beginn der AFS (Std. n. L.)	Relative Exkretmenge	Phase des Hauptanstiegs (Std. n. L.)
Standardbedingungen	100	13,5 - 14,5	100	13 - 17
- Mn	67	14	145	13 - 17
- Mg	70		190	
Ca x 5	94		40	
SO_4^{--} 1,5 x 10^{-5} M	58	16	260	9 - 16
1 x 10^{-6} M	44	16	210	
PO_4^{3-} 6 x 10^{-6} M	61		175	
x 10	44		800	
NO_3^- 100 mg/l	57		95	
x 10	92		210	
N_8 x 10	44		870	

4. Diskussion

4.1. Methoden-Kritik

4.1.1. Abtrennung der Algen von der Nährlösung

Laut Definition (S. 13) handelt es sich bei der extrazellulären gelösten organischen Substanz nur um solche Verbindungen, die von lebenden und unverletzten Zellen in das umgebende Medium abgegeben werden. Es erhebt sich die Frage, ob die Zellen nicht durch den Filtrationsvorgang beschädigt werden können, so daß es zu einer künstlichen Erhöhung der gel. O. S.-Werte kommt. Ein Vorversuch schloß diese Möglichkeit weitgehend aus: Eine stark verkürzte Filtration (5 sec dauernde Vorfiltration durch ein 8 µm-Filter und anschließende Trennung durch ein 0,1 µm-Filter) führt zum gleichen Ergebnis wie die 45 sec dauernde Filtration durch ein 0,1 µm-Filter. In Untersuchungen von FORSBERG & TAUBE (1967) ergaben C-Analysen dekantierter Zentrifugatüberstände u. a. von Scenedesmuskulturen die gleichen Werte wie nach Filtration der Suspensionen. ALLEN (1956) verglich bei Chlamydomonaskulturen den Gehalt der gelösten organischen Substanz in Filtraten mit dem Gehalt im Überstand ultrazentrifugierter Proben und fand ebenfalls keinen Unterschied.

Autolyseprozesse während des Wachstums der Algen sind nach Versuchen von GOCKE (1969) als vernachlässigbar gering anzunehmen.

4.1.2. Adaptation der Kulturen

Im Hinblick auf die Anwendung der Ergebnisse auf Freilandkulturen, bei denen Übergangseffekte sicher eine Rolle spielen, erfolgten die meisten Versuche an nicht adaptierten Kulturen.

Da von theoretischem Interesse, wurde zum Vergleich auch mit Kulturen gearbeitet, die vor Versuchsbeginn 3 bis 4 Tage unter der jeweils geänderten Bedingung kultiviert wurden. Dieser Zeitraum reichte aus, um eine zuletzt gleichbleibende O. $D._{24}$ zu erhalten. Dies bedeutet zwar nicht, daß sich alle physiologischen Prozesse schon an den geänderten Faktor angepaßt haben müssen, jedoch sollte zumindest eine Tendenz der Adaptationswirkung erkennbar sein.

4.1.3. Abzug der Blindwerte bei der Bestimmung der gesamten gel. O. S.

Der Blindwert für die gel. O. S. beträgt in der verwendeten Nährlösung N_8 infolge der darin enthaltenen EDTA etwa 2 mg C/l (Eichsubstanz: Glucose). Da dieser Blindwert zu Beginn des LDW viel zu hohe relative Exkretmengen vortäuschen würde, war es erforderlich, ihn von den erhaltenen Werten abzuziehen. Es muß erwähnt werden, daß EDTA z. T. von den Algen aufgenommen wird und außerdem in geringem Maße einem Photozerfall unterliegt. Entsprechend den Versuchen von KRAUSS & SPECHT (1958) mit ^{14}C-EDTA nimmt Scenedesmus obliquus je Fe-Atom etwa ein EDTA-Molekül auf. Bei dem gegebenen Angebot von 1 mg Fe/l (vgl. Tab. 1; S. 10) enthält Scenedesmus 276 - 3a unter unseren Standardbedingungen am Ende des LDW 0,27 mg Fe/g TS (RUNKEL, unveröff.). Da beim Überimpfen mit den Algen (120 mg TS/l) etwa 0,03 mg Fe/l in die frische Nährlösung eingebracht werden, beträgt der Fe-Verbrauch etwa 0,24 mg Fe/l = 24 % des eingesetzten Fe. Nehmen wir nach KRAUSS & SPECHT (1958) an, daß der gleiche Prozentsatz des EDTA aufgenommen wird, und nehmen wir aufgrund der Daten von KRAUSS & SPECHT (1958) weiter an, daß 5 % des EDTA durch Photozerfall komplett zerstört werden, dann

ergibt sich am Ende des LDW ein Verlust von knapp 30 % des eingesetzten EDTA. Dadurch verringert sich der Blindwert über den ganzen LDW gesehen um 0,6 mg C/l (Eichsubstanz: Glucose). In bezug auf die experimentellen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit hat diese Veränderung des Blindwertes keine nennenswerte Bedeutung. Durch den jeweiligen Abzug des vollen Blindwertes kann die Konzentration der gel. O. S. allenfalls etwas unterschätzt worden sein, was in Anbetracht der teilweise um ei Vielfaches gegenüber Standardbedingungen erhöhten Konzentrationen nicht ins Gewicht fällt.

4.2. Menge und Art der Akkumulate

Die Nettoproduktion an Exkreten, d. h. die absolute Erhöhung der Exkretmenge innerhalb 24 Std., beträgt unter Standardbedingungen etwa 4 mg C/l. Bezogen auf den zellgebundenen Kohlenstoff macht der gelöste organische Kohlenstoff etwa 1 % aus, bezogen auf die Einzelzelle etwa 5×10^{-13} g C/Zelle x 24 Std.

Stichproben aus Kulturen anderer Algenarten ergaben für Chlorella und Coelastrum ähnliche Gehalte an Exkreten wie Scenedesmus-Kulturen (ca. 5 mg C/g TS'), dagegen für Euglena und besonders Spirulina deutlich höhere Werte (Euglena: 12 mg C/g TS', Spirulina: 30 mg C/g TS').

Die Mengenangabe bei WELLER et al. (1973) - 4 µg C/mg TS oder 1 % des gesamten C-Gehaltes der Alge; für Synchronkulturen von Chlorella pyrenoidosa unter ähnlichen Kulturbedingungen - stimmt gut mit den vorliegenden Befunden überein. Es ist zu bemerken, daß WELLER die C-Bilanzen mit der ^{14}C-Methode ermittelte.

Bakterienzusatz zu Scenedesmus-Kulturen vermindert die Kon-

zentration gelöster O. S. erheblich, ein Befund, der auch bei WEINMANN (1970) beschrieben wurde. Die besonders niedrigen Konzentrationen der extrazellulären O. S. in Freilandkulturen sind aufgrund der Laborversuche mit bakterienhaltigen Kulturen so zu interpretieren, daß die kommensalischen Bakterien die von den Algen abgegebene O. S. zu einem beträchtlichen Teil metabolisiert haben müssen. Die Vermehrung von Bakterien aufgrund von extrazellulären Algenprodukten spielt auch in natürlichen Gewässern eine wichtige Rolle (OVERBECK 1972; BAULD & BROCK 1974; WRIGHT 1975).

Wie in Batchkulturen von Scenedesmus quadricauda (GOCKE 1969; WEINMANN 1970) sind auch in den hier untersuchten Synchronkulturen von Scenedesmus 276 - 3a Peptide und Kohlenhydrate die Hauptbestandteile der gel. O. S. Die Verbindungen mit Molekulargewichten ≥ 1500 bestehen sogar meist zu über 90 % aus diesen beiden Komponenten. Je nach Kulturbedingung ist der Anteil der Kohlenhydrate und Peptide an der gesamten gel. O. S. unterschiedlich (vgl. S. 34, S. 53, S. 71 und S. 80); daß die chemische Zusammensetzung extrazellulärer Produkte weitgehend von den Außenbedingungen abhängt, ergaben auch Untersuchungen von BROWN & GEEN (1974) an Chlamydomonaskulturen, die mit verschiedenen Wellenlängen des Lichts bestrahlt wurden).

Übereinstimmung mit WEINMANN (1970) besteht auch insofern, als in den untersuchten Kulturen Glykolsäure nur in sehr geringen oder nicht nachweisbaren Konzentrationen vorgelegen hat. Demnach kann extrazelluläre Glykolsäure bei Scenedesmus acutus wohl nicht die Rolle spielen, die dieser Säure bei anderen Objekten zuzukommen scheint (FOGG, NALEWAJKO & WATT 1965; FOGG 1971). Die Mitteilung von HESS et al. (1967) über

die Ausscheidung von Glykolat durch synchrone Kulturen von Scenedesmus obliquus bezieht sich übrigens auf das Vermögen, unter ganz bestimmten Bedingungen Glykolat an das Medium abzugeben, und nicht auf den Nachweis von Glykolat in der Nährlösung laufender Synchronkulturen (s. HELLEBUST 1974).

4.3. Frage der Entwicklungsabhängigkeit der Akkumulatbildung

Die Beziehung zwischen der Akkumulation extrazellulärer Algenprodukte und dem physiologischen Zustand der Kulturen wurde bisher meist an Batch-Kulturen untersucht. Kennzeichnend für solche Kulturen von Chlorella vulgaris oder Chlamydomonas reinhardtii ist das Auftreten extrazellulären Glykolats während der logarithmischen Wachstumsphase (NELSON & TOLBERT 1969, ORTH et al. 1966, TOLBERT & ZILL 1956, WATT & FOGG 1966). Bei Annäherung an die stationäre Phase treten dagegen vorwiegend Polysaccharide im Kulturmedium auf (AARONSON 1971, GUILLARD & WANGERSKY 1958, MOORE & TISCHER 1964, NALEWAJKO & LEAN 1972). Synchronkulturen wurden nur in wenigen Fällen für Untersuchungen über extrazelluläre organische Verbindungen eingesetzt, wobei man sich meist auf die Feststellung von Konzentrationsänderungen extrazellulären Glykolats beschränkte (z. B. CODD & MERRETT 1971, GIMMLER et al. 1969, KOWALLIK & SCHMID 1971). Ein Vorteil dieser Art der Kultivierung ist darin zu sehen, daß sie uns ermöglicht, die einzelnen Akkumulationsphasen der gel. O. S. im Zusammenhang mit dem Entwicklungszustand der Algenzellen zu betrachten und daraus Rückschlüsse auf die Entwicklungsabhängigkeit des Auftretens gelöster O. S. zu ziehen. Allgemein ist die Akkumulation gelöster O. S. im Verlauf der Zellentwicklung in Synchronkulturen von Scenedesmus 276 - 3a dadurch charakterisiert, daß in derjenigen Phase des LDW, die

sich durch höchste Trockengewichtsproduktion auszeichnet (etwa 10. bis 12. Std. n. L.; Abb. 1, S. 18), minimale Konzentrationen gelöster O. S. vorliegen; dagegen steigt die Konzentration der gel. O. S. im Medium an, sobald die Biomasseproduktion nach der 12. Std. n. L. abnimmt (Abb. 6 und 7; S. 29 und 30).

Nach den vorliegenden Ergebnissen treten die für Standardbedingungen charakteristischen Maxima und Minima der Exkretmengen (Abb. 6, S. 29) auch unter veränderten Kulturbedingungen auf. Es liegt daher nahe anzunehmen, daß der Verlauf der Akkumulation einer in der Zellentwicklung festgelegten Rhythmik unterliegt. Für die ersten beiden Peaks zur 2. und 6. Std. n. L. trifft diese Annahme höchstwahrscheinlich zu; ihre zeitliche Lage wird weder durch Änderung der Verdünnungszeiten noch durch das einsetzende Licht beeinflußt. Dagegen ruft eine Erniedrigung der Ausgangsdichte, die eine Entwicklungsbeschleunigung zur Folge hat (kenntlich an der vorverlegten AFS; S. 27), auch eine Vorverlegung der zu Beginn der Lichtphase auftretenden Peaks hervor (Abb. 15).

Undurchsichtiger dagegen ist die Frage der Entwicklungsabhängigkeit bei dem Konzentrationsanstieg der gel. O. S. im 2. Drittel der Lichtphase. Unter Standardbedingungen läuft dieser Anstieg etwa gleichzeitig mit der AFS ab. In CO_2- oder Sulfat-Mangelkulturen setzt er dagegen deutlich früher, die AFS jedoch später ein als unter Standardbedingungen. Offensichtlich sind also AFS und Konzentrationsanstieg unabhängige Prozesse, die in Standardkulturen nur zufällig zeitlich zusammenfallen. Da der Zeitpunkt der AFS üblicherweise als Kriterium für die Entwicklung einer Zelle benutzt wird, müßte man außerdem den Schluß ziehen, daß der Anstieg entwicklungsunabhängig ist. Tatsächlich aber gibt es Hinweise, daß unter

Mangelbedingungen die Entwicklung der Algenzellen in den ersten Stunden nach Überführung ins Mangelmedium beschleunigt abläuft, während die schließlich erfolgende AFS verzögert wird. So kann man den frühzeitigen Anstieg des Kohlenhydratgehalts bzw. die frühzeitige Chlorophyll- und Rohprotein-Abnahme der Zellen in Sulfat-Mangelkulturen als äquivalent mit einer Entwicklungsbeschleunigung deuten (vgl. auch die anfänglich schnellere O. D.-Zunahme der Sulfat-Mangelkulturen gegenüber N_8-Kulturen; Abb. 23 A). McLEAN (1967) wies für Batch-Kulturen von Spongiochloris nach, daß sich die Algen in Nährstoffmangelmedien schneller entwickeln als in den Kontrollmedien.

Es ist nach dem Gesagten nicht auszuschließen, daß auch der Hauptanstieg der Akkumulation in der 2. Lichthälfte entwicklungsabhängig ist. Träfe dies zu, so wäre ein beschleunigter Entwicklungsablauf die Ursache für einen frühzeitiger als unter Standardbedingungen einsetzenden Konzentrationsanstieg der gel. O. S.

4.4. Wirkung geänderter Kulturbedingungen auf die Akkumulation gelöster O. S.

Aus den tabellarischen Zusammenfassungen (Tab. 12 und 19; S. 56 und S. 81) bzw. aus Abbildung 17 B, C (S. 47) ist abzuleiten, daß in den meisten Fällen die Konzentration der gel. O. S. im Medium in einem gewissen Bereich der Faktorendosierung zunächst um so größer ist, je weiter sich die Kulturbedingungen vom Optimalbereich entfernen. Bei stärker suboptimalen Bedingungen, die das Wachstum um mehr als 70 % einschränken (z. B. bei sehr geringer Beleuchtungsstärke oder bei sehr

schwacher Begasung), läßt schließlich auch die Akkumulation gelöster O. S. wieder nach.

Über die allgemeinen Bedingungen, welche bei Planktonalgen die Abgabe organischer Verbindungen an das Medium begünstigen, schreibt HELLEBUST (1974):"In general, any environmental condition which inhibits cell multiplication, but still permits photoassimilation to continue, results in the release of high proportions of the photoassimilate." (p. 850). Diese Formulierung beinhaltet letzten Endes die Annahme, daß die Akkumulation der gel. O. S. sich erhöht, wenn es im Zellinneren zu einem Überschuß an Metaboliten kommt, deren normaler Umsatz bzw. Einbau in Folgeprodukte aus irgendwelchen Gründen gestört ist. Die Folge ist ein Stoffwechselungleichgewicht, das zu einem Efflux der im Überschuß vorliegenden Metaboliten führt.

Ungleichgewichte zwischen Produktion und Umsatz von Photosyntheseprodukten sind bei Algen-Batchkulturen vor allem für den Übergang vom exponentiellen Wachstum in die Stationärphase beschrieben worden. Diese ist gekennzeichnet durch steigenden Kohlenhydrat/Protein-Quotienten (z. B. CONOVER 1975) und im Endstadium durch die Speicherung fetten Öls (z. B. FOGG 1965). In Übereinstimmung mit der vorstehend genannten Hypothese wird beim Übergang in die Stationärphase ein weit höherer Anteil der Photosyntheseprodukte ins Medium abgegeben als während des aktiven Wachstums (HELLEBUST 1967; WEINMANN 1970).

Vergleichbar mit dem Übergang in die Stationärphase, der meist durch einsetzenden Nährstoffmangel hervorgerufen wird, sind die in dieser Arbeit untersuchten Wirkungen partiellen Nährstoffentzugs (Tab. 19). Die unter diesen Bedingungen auftretende Konzentrationszunahme extrazellulärer O. S. ist bisher bei Algen fast nicht (Ausnahme: SAKSHAUG et al. 1973

bei Amphidinium carteri in N- und P-Mangel-Medium) beschrieben worden und von ökologischem Interesse.

Am Beispiel des durch partiellen Sulfatentzug ausgelösten Konzentrationsanstiegs der gelösten O. S. (Abb. 23 B, C) wird besonders deutlich, daß dieser Effekt am stärksten ausgeprägt ist, wenn die Biomasseproduktion je 24 Std. etwa auf 50 % des Kontrollwerts gesenkt ist. Verschärfter Sulfatentzug läßt hingegen keine maximale Akkumulation gelöster O.S. mehr zu. Die Auswirkungen des partiellen Sulfatentzugs wurden auch hinsichtlich ihrer Kinetik untersucht. Dabei zeigte sich, daß der Kohlenhydratgehalt der Zellen übernormal und mehrere Stunden früher als in den Kontrollkulturen ansteigt und daß es gleichzeitig zu einem nahezu kompletten Stillstand des N-Einbaus sowie der Chlorophyllsynthese kommt (Abb. 25, E - K). Erst etwa 4 Std. darauf beginnt der massive Anstieg der Konzentration gelöster O. S. im Medium, und zwar dann, wenn Trockengewichts- und O. D.-Zunahme unter die entsprechenden Kontrollwerte absinken (Abb. 25, A bis D). Es ist darauf hinzuweisen, daß es im Laufe der synchronen Zellentwicklung von Scenedesmus 276 - 3a unter Standardbedingungen 12 Std. n. L. zum Hauptanstieg der gel. O. S. kommt, d. h. zu einem Zeitpunkt, zu dem wiederum die Substanzproduktion abnimmt, der Rohproteingehalt sinkt und der Kohlenhydratgehalt steigt (vgl. die Kontrollwerte in Abb. 25 sowie MÜLLER 1961). Im Zusammenhang hiermit stellt sich die Frage, ob der allgemein bei Synchronkulturen von Grünalgen gegen Ende der Lichtphase erfolgende Anstieg des Kohlenhydratgehalts (PIRSON & LORENZEN 1966) als Anzeichen für ein Stoffwechselungleichgewicht gewertet werden darf.

In Zellen der Sulfatmangelkulturen tritt ein physiologisches Ungleichgewicht auf, das durch einen relativ hohen Kohlenhy-

drat-Rohprotein-Quotienten charakerisiert ist. Im Filtrat dieser Kulturen finden sich dementsprechend relativ hohe Kohlenhydratkonzentrationen (Abb. 26). Auch bei Kultur von Grünalgen in Mg- oder P-Mangelmedium bzw. bei höheren Temperaturen oder Nährstoffkonzentrationen ist ein erhöhter Kohlenhydrat-Protein-Quotient nachzuweisen (vgl. PIRSON et al. 1952 für Ankistrodesmus; HEALEY & HENDZEL 1975 für Scenedesmus quadricauda; TISCHNER & LORENZEN 1974 für Chlorella pyrenoidosa; WETHERELL 1963 für Scenedesmus obliquus). Falls diese Befunde auf Scenedesmus 276 - 3a übertragbar sind, wäre die erhöhte Akkumulation gelöster O. S. bei überoptimaler Temperatur oder Nährstoffkonzentration bzw. Mg- oder P-Mangel ebenfalls mit dem durch relativen Kohlenhydratüberschuß ausgelösten Ungleichgewicht erklärbar.

Demgegenüber verschiebt sich nach den Untersuchungen von KOWALLIK (1962) bzw. STABENAU (1972) das Verhältnis Kohlenhydrat/Rohprotein in schwach belichteten Kulturen bzw. CO_2-Mangelkulturen von Chlorella bzw. Chlorogonium elongatum zugunsten des Rohproteins. Man sollte deshalb nach unserer Hypothese in den extrazellulären Akkumulaten relativ hohe Peptidgehalte erwarten. Für schwach begaste Kulturen gelang der Nachweis, daß der Anteil peptidartiger Verbindungen an der gesamten gel. O. S. in der Tat höher lag als in Standardkulturen (S. 52 bzw. Abb. 21).

Die "Faustregel" HELLEBUSTs (s. S. 89) steht im Prinzip mit unseren Versuchsergebnissen im Einklang. Während seine Formulierung aber mehr auf ein Ungleichgewicht zwischen Produktion und Umsatz der Gesamtheit der Intermediate abzielt, wird aus unseren Untersuchungen deutlich, daß besonders Änderungen der Mengenverhältnisse bestimmter Zellinhaltsstoffe

für die Akkumulation gelöster O. S. eine Rolle spielen. Da in Synchronkulturen erhöhte Exkretkonzentrationen auftreten können, bevor die Zellteilung begonnen hat, sollte der Begriff "cell multiplication" in HELLEBUSTs Formulierung besser durch Biomassezunahme ersetzt werden. Unter Berücksichtigung dieser Befunde wird hinsichtlich der Bedingungen, welche die Akkumulation gelöster O. S. fördern, folgende Hypothese aufgestellt: Faktoren, die zu einer Verminderung der Biomassezunahme und gleichzeitig zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Kohlenhydrat und Rohprotein in der Zelle führen, fördern die Akkumulation gelöster O. S., sofern die Produktion der Metaboliten selbst nicht gestört ist. Im Zustand eines physiologischen Ungleichgewichts im hier angesprochenen Sinne erfüllt die Ausscheidung organischer Substanz eine Ventilfunktion.

Von nicht zu unterschätzendem Einfluß auf die Akkumulation extrazellulärer organischer Substanz ist außer dem Anstau von Stoffwechselprodukten im Zellinnern die Permeabilität des Plasmalemmas für Substanzen, die ins Medium abgegeben werden. So vermindert Ca, das die Permeabilität senkt (LÜTTGE 1969, STADELMANN 1969), in Überdosis die Akkumulation extrazellulärer, gelöster O. S. (S. 60). Beim Auftreten gelöster O. S. könnte auch die Hydrolyse von Polysacchariden der Zellwand vor der Autosporenfreisetzung (AFS) eine Rolle spielen. So fanden LANG & CHRISPEELS (1975) in Chlamydomonaskulturen eine gleichzeitig mit der AFS erfolgende Abgabe von Zellwand-Glykoproteinen ins Medium. Bei Scenedesmus 276 - 3a scheint der Hauptanstieg der gel. O. S. allerdings nicht unmittelbar mit der AFS korreliert zu sein (S. 87). Eine gänzlich untergeordnete Rolle bei der Anhäufung gelöster O. S. im Medium dürfte die enzyma-

tische Hydrolyse der Mutterzellwände nach erfolgter AFS spielen, wie die nahezu gleichbleibende Konzentration der Akkumulation während der Dunkelphase des LDW beweist.

Bei Überführung von Scenedesmus acutus in Medien 10-fach übernormaler Nährsalzkonzentration ergaben sich die absolut höchsten Konzentrationen gelöster O. S., die im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen auftraten. Bekanntlich besitzen verschiedene Algenarten die Fähigkeit, bei osmotischer Belastung durch Synthese organischer Substanzen ein osmotisches Gleichgewicht mit dem Medium einzustellen, z. B. erhöht Platymonas seine intrazelluläre Mannitkonzentration (KIRST 1975) oder Ochromonas seinen Isofloridosidgehalt (KAUSS, LÜTTGE & KRICHBAUM 1975). WELLER et al. (1973) fanden, daß osmotische Schocks die Ausscheidung gelöster O. S. in Synchronkulturen von Chlorella pyrenoidosa nicht beeinflussen. Übereinstimmend damit ist der Konzentrationsanstieg der gel. O. S. in N_8 x 10-Medium nicht allgemein auf die Wirkung hoher Ionenkonzentration zurückzuführen, sondern hauptsächlich auf die spezifische Wirkung der überoptimalen Phosphatdosis. Der Anteil der Kohlenhydrate an der gesamten gel. O. S. ist in N_8 x 10-Medium besonders hoch. Bei einigen Blaualgen, die erhöhter NaCl-Konzentration ausgesetzt wurden, konnte ebenfalls eine gesteigerte Kohlenhydratausscheidung nachgewiesen werden (SCHIEWER 1974).

Von größerer ökologischer Relevanz ist die Zunahme der relativen Exkretmenge bei suboptimaler Phosphatversorgung (Abb. 29 C). In nicht verunreinigten Binnengewässern herrscht in der Regel P-Mangel (LUND 1965) und, sofern die an Scenedesmus acutus erarbeiteten Befunde allgemeinere Gültigkeit besitzen, muß man damit rechnen, daß die Phosphatverknappung auch in der

Natur zur verstärkten Akkumulation gelöster O. S. im Wasser führt (HELLEBUST 1974).

Erwähnenswert ist auch die von HEALEY & HENDZEL (1975) beobachtete Abgabe von Phosphatasen im Phosphat-Mangelmedium. In den untersuchten Chemostat-Kulturen von Scenedesmus quadricauda steigt diese Abgabe mit fallender P-Konzentration zunächst an. Wird jedoch eine bestimmte Wachstumsleistung unterschritten, so geht die extrazelluläre Phosphatase-Konzentration wieder zurück.

Die Abhängigkeit der Biomasseproduktion von der aktuellen Sulfatkonzentration zeigt, daß periodisch verdünnte Kulturen, wi sie im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, nur sehr bedingt zur Optimierung von Nährstoffkonzentrationen eingesetzt werden können (Abb. 23 A). Hier erweist sich z. B. die Sulfatkonzentration, die 6 Std. n. L. den maximalen Ertrag ergibt ($2{,}0 \times 10^{-5}$ M), als völlig unzureichend zur Erzielung eines maximalen Ertrags zu Ende des LDW (24 Std. n. L.). Die Verwendung der Enddichten periodisch verdünnter Synchronkulturen zur Bestimmung von Konzentrationsoptima einzelner Nährstoffe (z. B. SOEDER et al., 1967) kann infolgedessen nicht zu realistischen, sondern nur zu stark überhöhten Konzentrationsangaben führen. Dies ist abgesehen von der Suspensionsdichte, sicherlich eine der wesentlichen Ursachen dafür, daß die für nicht-kontimuierliche Laborkulturen als optimal angesehenen Nährstoffkonzentrationen um vieles höher liegen als in hochproduktiven Gewässern (SOEDER et al., 1971).

4.5. Anwendung der Ergebnisse auf die Mikroalgenmassenkultur

Die Bestimmungen der gel. O. S. in den Filtraten von Freilandkulturen ergaben für die Mittagsstunden die niedrigsten Werte. Morgens und abends, also in Phasen ungünstiger Lichtverhältnisse, wurden höhere Exkretmengen ermittelt (Abb. 12, S. 36). Damit läßt sich das Verhalten von Freilandkulturen insofern in das entworfene Schema einfügen, als die Akkumulation der gel. O. S. in gewissen Grenzen mit abnehmender Wachstumsintensität ansteigt.

Im Prinzip sollten sich einige der an nicht adaptierten Laborkulturen gewonnenen Ergebnisse auf Freilandkulturen übertragen lassen. (Auch diese sind aufgrund des Tag-Nacht-Rhythmus bis zu einem gewissen Grad synchronisiert, außerdem spielen Adaptationseffekte wegen der sich ständig ändernden mikroklimatischen Voraussetzungen sicher eine Rolle.)

Trotz offensichtlich suboptimaler Wachstumsbedingungen, die in Laborkulturen meist zu einer gesteigerten Akkumulation der gel. O. S. führen, liegen in Freilandkulturen jedoch keine erhöhten Konzentrationen an Exkreten vor. Dafür lassen sich mehrere Gründe angeben:

1. Nach den vorliegenden Befunden verhindern niedrige Temperaturen die Akkumulation größerer Mengen gelöster O. S., und im Freiland liegen die Temperaturen unter mitteleuropäischen Klimabedingungen meist erheblich unter dem Temperaturoptimum von Scenedesmus acutus (32°C).
2. Bakterien (und Pilze), die im Freiland in größerer Zahl vorhanden sind, veratmen oder inkorporieren einen Teil der von den Algen ausgeschiedenen Substanzen.
3. Die Energieversorgung durch Licht könnte - besonders bei

bedecktem Himmel - zu schwach sein, um eine gesteigerte Produktion extrazellulärer organischer Substanz zu erlauben. Wie aus den Belichtungsversuchen (Tab. 6, S. 38) hervorgeht, tritt bei sehr geringen Lichtintensitäten keine vermehrte Akkumulation gelöster O. S. auf.

Neben einem Ausbeuteverlust organischer Substanz führt die Anreicherung gelöster O. S. im Medium zu vermehrtem Bakterien- und Pilzwachstum. Die vorliegenden Befunde erlauben die Voraussage, daß besonders bei hohen Temperaturen, schlechten Lichtbedingungen, CO_2-Ausfall oder stark schwankenden Klimaverhältnissen (nicht aber bei tieferen Temperaturen) mit erhöhten Konzentrationen extrazellulärer gelöster organischer Substanz gerechnet werden kann.

5. Zusammenfassung

In Filtraten synchroner, steriler Laborkulturen von Scenedesmus 276 - 3a sowie von Freilandkulturen wurde der extrazelluläre gelöste organische Kohlenstoff mittels der "Dichromat-Methode" quantitativ bestimmt. Wie sich zeigte, hängt die Akkumulation organischer Exkrete wesentlich vom Entwicklungsstadium der Zellen und den eingestellten Kulturbedingungen ab.

Im Verlauf der synchronen Zellentwicklung ist die im Medium auftretende Exkretmenge in Phasen niedriger Wachstumsintensität relativ hoch, in Phasen hoher Wachstumsintensität dagegen relativ gering. In den ersten 6 Std. n. L., die durch geringe Wachstumsleistung charakterisiert sind, treten zwei Maxima der extrazellulären, gelösten organischen Substanz (gel. O. S.) auf. Während der Hauptwachstumsphase zwischen der 7. und 11. Std. n. L. ist die Konzentration der gel. O. S. minimal. Diese beginnt 12 Std. n. L. mehr oder minder stark anzusteigen, während sich die Biomassezunahme wieder verringert.

Die Exkretmengen im Filtrat von Freilandkulturen sind während der Tagesstunden ebenfalls Schwankungen unterworfen, die eine Abhängigkeit von der Wachstumsintensität erkennen lassen.

Bei den Ausscheidungsprodukten der sterilen Laborkulturen handelt es sich vorwiegend um Peptide verschiedenen Molekulargewichts und Kohlenhydrate. Ihre Summe beträgt bei den Verbindungen mit Molekulargewichten $\geq$ 1500 mehr als 80 % der gel. O. S. Unter verschiedenen Außenbedingungen treten charakteristische Unterschiede hinsichtlich der prozentualen Anteile von Kohlenhydraten und Peptiden am Gesamt der gel. O. S. auf.

Gegenüber den unter Standardbedingungen wachsenden Kulturen wurde ein Rückgang der gel. O. S. nur verzeichnet bei Dauerlicht und höherer CO_2-Zufuhr, d. h. Bedingungen, die den Vermehrungsfaktor weiter steigern; zum anderen bei verminderter Temperatur (25°C) und bei sehr schwachen Lichtintensitäten (< 1 klux). Die Mehrzahl der untersuchten, wachstumsbeeinträchtigenden Außenfaktoren bewirken eine Zunahme der auf TS bezogenen Exkretmengen (Tab. 12 und 19). Das gilt insbesondere für verringerte Lichtintensitäten (Tab. 6), schwache CO_2-Begasung (Abb. 17), Sulfatmangel (Abb. 23) und Phosphatentzug (Abb. 29). Das Maximum der Akkumulation gelöster O. S. liegt je nach Außenbedingung in einem Bereich, in dem die Wachstumsleistung um 50 bis 70 % gehemmt wird.

Superoptimale Bedingungen, wie hohe Temperaturen, Überdosen an Phosphat und Nitrat, nicht aber überoptimale Dosen von Ca^{2+} oder SO_4^{2-}, bewirken ebenfalls eine mehr oder minder starke Förderung der Akkumulation gelöster O. S.

Als Hauptursache für das Auftreten erhöhter Exkretkonzentrationen werden Ungleichgewichte zwischen Synthese und Verbrauch verschiedener Metabolite angesehen. Derartige Ungleichgewichte sollten sich einstellen, wenn bei einer Änderung der Außenfaktoren bestimmte Verbindungen (z. B. Kohlenhydrate) bevorzugt synthetisiert oder nicht mit normaler Intensität metabolisiert werden. Dadurch sollte es zu einem Anstau der entsprechenden Stoffwechselprodukte kommen und bei ausreichender Permeabilität des Plasmalemmas infolgedessen auch zu einem gesteigerten Efflux der betreffenden Substanzen.

6. Literaturverzeichnis

AARONSON, S. (1971): The synthesis of extracellular macromolecules and membranes by a population of the phytoflagellate Ochromonas danica. Limnol. and Oceanogr. 16, 1 - 9.

ALBRECHT, D. & J. OVERBECK (1969): Wasseranalysen in der Limnologie mit Hilfe des Technicon Autoanalyzers. Technicon Wasserkolloquium 19. Sept. 1969, Bad Nauheim.

ALLEN, M. B. (1956): Excretion of organic compounds by Chlamydomonas. Arch. Mikrobiol. 24, 163 - 168.

BADOUR, S. S. & E. R. WAYGOOD (1971): Excretion of an acid semialdehyde by Gloeomonas. Phytochem. 10, 967 - 976.

BAULD, J. & T. D. BROCK (1974): Algal excretion and bacterial assimilation in hot spring algal mats. J. Phycol. 10, 101 - 106.

BÖGER, P. (1964): Das Strukturproteid aus Chloroplasten einzelliger Grünalgen und seine Beziehung zum Chlorophyll. Flora 154, 174 - 221.

BROWN, T. J. & G. H. GEEN (1974): The effect of light quality on the carbon metabolism and extracellular release of Chlamydomonas reinhardtii DANGEARD. J. Phycol. 10, 213 - 220.

BURCZYK, J., H. GRZYBEK, J. BANAŚ & E. BANAŚ (1970): Presence of cellulase in the algae Scenedesmus. Exp. Cell Research 63, 451 - 453.

BURLEW, J. S. ed. (1964): Algal culture from laboratory to pilot plant. Carnegie Institution of Washington Publication, Wash. D. C.

CALKINS, V. P. (1943): Microdetermination of glycolic and oxalic acids. Analyt. Chem. 15, 762 - 763.

CHANG, W. H. & N. E. TOLBERT (1970): Excretion of glycolate, mesotartrate and isocitrate lactone by synchronized cultures of Ankistrodesmus braunii. Plant Physiol. 46, 377 - 385.

CONOVER, S. A. M. (1975): Partitioning of nitrogen and carbon in cultures of the marine diatom Thalassiosira fluviatilis supplied with nitrate, ammonium, or urea. Marine Biology 32, 231 - 246.

FOGG, G. E. (1962): Extracellular products. In: Physiology and Biochemistry of Algae (ed. R. A. LEWIN) Acad. Press, New York and London, 475 - 489.

FOGG, G. E. (1965): Algal cultures and phytoplankton ecology. University of Wisconsin Press, Madison and Milwaukee.

FOGG, G.E. (1966): Environmental conditions and the pattern of metabolism in algae. In: Algae and Man (ed. D. F. JACKSON) Plenum Press, New York, 77 - 85.

FOGG, G. E. (1971): Extracellular products of algae in freshwater. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 5, 1 - 25.

FOGG, G. E., C. NALEWAJKO & W. D. WATT (1965): Extracellular products of phytoplankton photosynthesis. Proc. R. Soc. (London) B 162, 517 - 534.

FORSBERG, C. & Ö. TAUBE (1967): Extracellular organic carbon from some green algae. Physiol. Pl. 20, 200 - 207.

GALLOWAY, R. A., I. ROLLE & C. J. SOEDER (1974): CO_2 fixation and biosynthetic activity of darkened synchronous Chlorella fusca. Arch. Hydrobiol. 73, 1 - 13.

GIMMLER, H., W. ULLRICH, J. DOMANSKI-KADEN & W. URBACH (1969): Excretion of glycolate during synchronous culture of Ankistrodesmus braunii in the presence of disalicylidene-propanediamine or hydroxypyridinemethanesulfonate. Plant Cell Physiol. 10, 103 - 112.

GOCKE, K. (1969): Untersuchungen über Abgabe und Aufnahme von Aminosäuren und Polypeptiden durch Planktonorganismen. Dissertation Kiel.

GUILLARD, R. R. L. & P. J. WANGERSKY (1958): The production of extracellular carbohydrates by some marine flagellates. Limnol. and Oceanog. 3, 449 - 454.

HEALEY, F. P. & L. L. HENDZEL (1975): Effect of phosphorus deficiency on two algae growing in chemostats. J. Phycol. 11, 303 - 309.

HELLEBUST, J. A. (1965): Excretion of some organic compounds by marine phytoplankton. Limnol. and Oceanogr. 10, 192 - 206.

HELLEBUST, J. A. (1967): Excretion of organic compounds by cultured and natural populations of marine phytoplankton. In: Estuaries (G. H. LAUFF, ed.) Am. Assoc. Adv. Sci. Publ. No. 83, Wash. D. C., 361 - 366.

HELLEBUST, J. A. (1974): Extracellular products. In: Algal Physiology and Biochemistry (ed. W. D. P. STEWART) Blackwell Sci. Publ., Oxford, 838 - 863.

HESS, T. L. & N. E. TOLBERT (1967): Glycollate pathway in algae. Plant Physiol. 42, 371 - 379.

HESS, J. L., N. E. TOLBERT & L. M. PIKE (1967): Glycollate biosynthesis by Scenedesmus and Chlorella in the presence or absence of $NaHCO_3$. Planta 74, 278 - 285.

HUNTSMAN, S. A. & R. T. BARBER (1975): Modification of phytoplankton growth by excreted compounds in low-density populations. J. Phycol. 11, 10 - 13.

KAUSS, H., U. LÜTTGE & R. M. KRICHBAUM (1975): Änderung im Kalium- und Isofloridosidgehalt während der Osmoregulation bei Ochromonas malhamensis. Z. Pflanzenphysiol. 76, 109 - 113.

KIRST, G. O. (1975): Beziehungen zwischen Mannitkonzentration und osmotischer Belastung bei der Brackwasseralge Platymonas subcordiformis HAZEN. Z. Pflanzenphysiol. 76, 316 - 325.

KOWALLIK, G. & G. H. SCHMID (1971): Zur Glykolatoxydation einzelliger Grünalgen. Planta 96, 224 - 237.

KOWALLIK, W. (1962): Über die Wirkung des blauen und roten Spektralbereichs auf die Zusammensetzung synchronisierter Chlorellen. Planta 58, 337 - 365.

KRAUSS, R. W. & A. W. SPECHT (1958): Nutritional requirements and yields of algae in mass culture. In: Trans. Conf. Solar Energy, Vol. IV, 12 - 28.

KYLIN, A. (1964): The influence of phosphate nutrition on growth and sulphur metabolism of Scenedesmus. Physiol. Plant. 17, 384 - 402.

LANG, W. & M. J. CHRISPEELS (1975): Analysis of cell wall protein synthesis during the vegetative cell cycle in Chlamydomonas reinhardii. Plant Physiol. 56/ Suppl., 81.

LEFÈVRE, M. (1966): Extracellular Products of Algae. In: Algae and Man (ed.D. F. JACKSON) Plenum Press, New York, 337 - 367.

LORENZEN, H. & J. SCHLEIF (1966): Zur Bedeutung der kürzestmöglichen Generationsdauer in Synchronkulturen von Chlorella. Flora (Jena) 156, 673 - 683.

LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL (1951): Protein measurement with the Folin Phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265 - 275.

LÜTTGE, U. (1969): Aktiver Transport. Protoplasmatologia VIII, 7b.

LUND, J. W. G. (1965): The ecology of freshwater phytoplankton. Biol. Rev. 40, 231 - 293.

MACKINNEY, G. (1941): Absorption of light by Chlorophyll solutions. J. Biol. Chem. 140, 315 - 322.

MARKER, A. F. H. (1965): Extracellular carbohydrate liberation in the flagellates Isochrysis galbana and Prymnesium parvum. J. Mar. Biol. Ass. U. K. 45, 755 - 772.

McLEAN, R. J. (1967): Desiccation and heat resistance of the green algae Spongiochloris typica. Can. J. Bot. 45, 1935 - 1938.

MEFFERT, M. E. & J. OVERBECK (1968): Wachstum von Scenedesmus obliquus in Abhängigkeit von der Eisenversorgung. Planta 78, 39 - 48.

MENGEL, K. (1968): Ernährung und Stoffwechsel der Pflanze. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

MILLER, R. M., C. M. MEYER & H. A. TANNER (1963): Glycolate excretion and uptake by Chlorella. Plant Physiol. 38, 184 - 188.

MOORE, B. G. & R. G. TISCHER (1964): Extracellular polysaccharides of algae: effects on life-support systems. Science (Washington) 145, 586 - 587.

MÜLLER, H. - M. (1961): Über die Veränderung der chemischen Zusammensetzung von Scenedesmus obliquus bei synchroner Kultur im Licht-Dunkel-Wechsel. Planta 56, 555 - 574.

NALEWAJKO, C. (1966): Photosynthesis and excretion in various planktonic algae. Limnol. Oceanogr. 11, 1 - 10.

NALEWAJKO, C. & D. R. S. LEAN (1972): Growth and excretion in planktonic algae and bacteria. J. Phycol. 8, 361 - 366.

NELSON, E. B. & N. E. TOLBERT (1969): The regulation of glycolate metabolism in Chlamyolomonas reinhardtii. Biochim. et Biophys. Acta 184, 263 - 270.

NULTSCH, W. (197): Allgemeine Botanik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

ORTH, G. M., N. E. TOLBERT & E. JIMENEZ (1966): Rate of glycolate formation during photosynthesis at high pH. Plant Physiol. 41, 143 - 147.

OVERBECK, J. (1972): Bakterien in der Nahrungskette im See. Umschau Wiss. Techn. 72, 358.

PAYER, H. D. & U. TRÜPER (1972): Ein Beitrag zur Versorgung dichter Kulturen von Grünalgen mit Mangan, Vanadium und anderen Spurenelementen. Arch. Mikrobiol. 84, 43 - 53.

PIRSON, A. & M. S. A. BADOUR (1961): Kennzeichnung von Mineralsalzmangelzuständen bei Grünalgen mit analytisch-chemischer Methodik. Flora 150, 243 - 258.

PIRSON, A. & H. LORCH ZUN (1966): Synchronized dividing algae. Ann. Rev. Plant Physiol. 17, 439 - 458.

PIRSON, A., C. TICHY & G. WILHELMI (1952): Stoffwechsel und Mineralsalzernährung einzelliger Grünalgen I. Vergleichende Untersuchungen an Mangelkulturen von Ankistrodesmus. Planta 40, 199 - 253.

ROBINSON, J. M. & M. GIBBS (1975): Effects of pH upon the photosynthesis of glycolic acid and the Warburg effect in intact spinach chloroplasts. Plant Physiol. 56 / Suppl., 140.

ROE, J. H. (1955): The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. J. Biol. Chem. 212, 335 - 343.

RUPPEL, H. G. (1962): Untersuchungen über die Zusammensetzung von Chlorella bei Synchronisation im Licht-Dunkel-Wechsel. Flora 152, 113 - 138.

SAKSHAUG, G., S. MYKLESTAD, T. KROGH & G. WESTIN (1973): Production of protein and carbohydrate in the dinoflagellate Amphidinium carteri. Some preliminary results. Norw. J. Bot. 20, 211 - 218.

SAUNDERS, G. W. (1957): Interrelations of dissolved organic matter and phytoplankton. Botan. Rev. 23, 389 - 409.

SCHIEWER, U. (1974): Salztoleranz und der Einfluß steigender NaCl - Konzentrationen auf den Stickstoff-, Kohlenhydrat-, Pigmentgehalt und die Kohlenhydratausscheidung bei einigen limnischen Blaualgen. Algological Studies 11, 171 - 184.

SCHIFF, J. A. (1962): Sulfur. In: Physiology and Biochemistry of Algae (ed. R. A. LEWIN) Acad. Press, New York and London, 239 - 246.

SENGER, H. (1970): Charakterisierung einer Synchronkultur von Scenedesmus obliquus, ihrer potentiellen Photosyntheseleistung und des Photosynthese-Quotienten während des Entwicklungszyklus. Planta 90, 243 - 266.

ŠETLIK, I., E. BERKOVÁ, J. DOUCHA, Š. KUBIN, J. VENDLOVÁ, V. ZACHLEDER (1972): The coupling of synthetic and reproduction processes. Arch. Hydrobiol. 41, 172 - 213.

SCOTT, G. T. (1943): The mineral composition of Chlorella pyrenoidosa grown in culture media containing various concentrations of calcium, magnesium, potassium, and sodium. J. Cell. Comp. Physiol. 21, 327 - 338.

SCOTT, G. T. (1944): Cation exchanges in Chlorella pyrenoidosa. J. Cell. Comp. Physiol. 23, 47 - 58.

SMITH, W. O. jr. (1974): The extracellular release of glycolic acid by a marine diatom. J. Phycol. 10, 30 - 33.

SODOMKOVA, M. (1972): Taxonomische Übersicht der Gattung Coelastrum NÄGELI. Acta Univ. Carol.-Biol. 1970, 481 - 512.

SOEDER, C. J. (1967): Zur Kinetik der Substanzproduktion in Synchronkulturen von Chlorella fusca Shihira et Krauss. Arch. Hydrobiol./Suppl. XXXIII, 92 - 100.

SOEDER, C. J. (1970): Zum Phosphat-Haushalt von Chlorella fusca Sh. et Kr. Arch. Hydrobiol./Suppl. 38, 1 - 17.

SOEDER, C. J. (1971): Mikroalgenkultur im technischen Maßstab. Biologie in unserer Zeit 1971, 133 - 164.

SOEDER, C. J. & A. RIED (1962): Über den Verlauf der Sporulation und der Protoplastenteilung in Synchronkulturen von Chlorella pyrenoidosa. Arch. Mikrobiol. 42, 176 - 189.

SOEDER, C. J., G. SCHULZE & D. THIELE (1967): Einfluß verschiedener Kulturbedingungen auf das Wachstum in Synchronkulturen von Chlorella fusca Sh. et Kr. Arch. Hydrobiol./Suppl. 33, 127 - 171.

SOEDER, C. J., H. MÜLLER, H. D. PAYER & H. SCHULLE (1971): Mineral nutrition of planctonic algae: some considerations, some experiments. Mitt. Internat. Verein Limnol. 19, 39 - 58

STABENAU, H. (1972): Über die Ausscheidung von Glykolsäure bei Chlorogonium elongatum DANGEARD. Biochem. Physiol. Pflanzen 163, 42 - 51.

STADELMANN, E. J. (1969): Permeability of the plant cell. Ann. Rev. Plant Physiol. 20, 585 - 606.

STENGEL, E. (1970): Anlagentypen und Verfahren der technischen Algenmassenproduktion. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 83, 589 - 606.

STRICKLAND, J. D. H. & T. R. PARSONS (1960): A manual of sea water analysis. III. 3. Determination of organic (oxidizable) matter as carbon. Bull. Fish. Res. Board Can. 125, 117 - 121.

SUNDBERG, I. & M. NILSHAMMAR- HOLMVALL (1975): The diurnal variation in phosphate uptake and ATP level in relation to deposition of starch, lipid, and polyphosphate in synchronized cells of Scenedesmus. Z. Pflanzenphysiol. 76, 270 - 279.

TISCHNER, R. & H. LORENZEN (1974): Effect of high growth temperature on cell compounds and enzymes in synchronized Chlorella. New Botanist 1, 72 - 88.

TOLBERT, N. E. & L. P. ZILL (1956): Excretion of glycolic acid by algae during photosynthesis. J. Biol. Chem. 222, 895 - 906.

WALSBY, A. E. (1974): The extracellular products of Anabaena cylindrica Lemm. I. Isolation of a macromolecular pigment-peptide complex and other components. Br. Phycol. J. 9, 371 - 381.

WATT, W. D. (1966): Release of dissolved organic material from the cells of phytoplankton populations. Proc. roy. Soc. (Lond.) A 164, 521 - 551.

WATT, W. D. & G. E. FOGG, (1966): The kinetics of extracellular glycollate production by Chlorella pyrenoidosa. J. Exp. Bot. 17, 117 - 134.

WEINMANN, G. (1970): Gelöste Kohlenhydrate und andere organische Stoffe in natürlichen Gewässern und in Kulturen von Scenedesmus quadricauda. Arch. Hydrobiol. 37, 164 - 242.

WELLER, H., W. HÖFNER & H. LINSER (1973): Art und Menge der Ausscheidung ^{14}C-markierter Verbindungen bei Chlorella pyrenoidosa unter dem Einfluß des osmotischen Drucks der Nährlösung. Physiol. Plant. 28, 554 - 556.

WETHERELL, D. F. (1963): Osmotic equilibration and growth of Scenedesmus obliquus in saline media. Physiol. Plantarum 16, 82 - 91.

WETZEL, R. G. (1969): Excretion of dissolved organic compounds by aquatic macrophytes. Bioscience 19, 539 - 540.

WIDENKA, S. (1975): Über das Wachstum planktischer Grün- und Blaualgen in Abhängigkeit von der CO_2 - Versorgung. Diplomarbeit, Dortmund.

WRIGHT, R. T. (1975): Studies on glycolic acid metabolism by freshwater bacteria. Limnol. Oceanogr. 20, 626 - 639.

ZELITCH, I. (1958): The role of glycolic acid oxidase in the respiration of leaves. J. Biol. Chem. 233, 1299 - 1303.

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 1971 bis Juni 1974 an der Kohlenstoffbiologischen Forschungsstation Dortmund (seit 1. Januar 1974: GSF, Abteilung Algenforschung) unter der wissenschaftlichen Leitung von Herrn Prof. Dr. C. J. SOEDER angefertigt. Für seine wertvollen Anregungen und die jederzeit großzügige Unterstützung möchte ich ihm meinen herzlichen Dank sagen.

Zu besonderem Dank bin ich auch Herrn Prof. Dr. W. OHLE und Herrn Prof. Dr. J. OVERBECK für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im MPI, Plön verpflichtet.

Frau L. ROGOVSKY sei für ihre Assistenz, Frau CH. BIENIAS und Herrn J. GROENEWEG für die Durchführung einiger Analysen gedankt. Mein Dank gilt nicht zuletzt Herrn Dr. D. ALBRECHT und Herrn H. H. STABEL, die mich bei den Untersuchungen zur chemischen Analyse der Filtrate unterstützten.

Die Untersuchungen wurden von 1971 bis Ende 1972 vom Ministerium für Wissenschaft und Forschung des Landes NRW, 1973 im Rahmen des Projekts BMFT 7 vom Bundesministerium für Forschung und Technologie und seit Beginn des Jahres 1974 von der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH, München, finanziert. Allen diesen Geldgebern möchte ich hiermit meinen besonderen Dank aussprechen.

Lebenslauf

Alfred Bolze, geboren am 16. Dezember 1945 in Hitzacker/Elbe als Sohn des Alfred Bolze und seiner Ehefrau Maria geb. Limmer. Konfession: evangelisch. Seit dem 30. Juli 1971 verheiratet mit Monika Bolze, geb. Jahn. Ein Kind.

1952 - 1966	Besuch der Volksschule und des Gymnasiums
23. 2. 1966	Reifeprüfung am Max-Planck-Gymnasium zu Dortmund
1. 4. 1966	Beginn des Studiums der Veterinärmedizin (die ersten beiden Semester) und der Biologie an der Justus-Liebig-Universität Gießen
12. 7. 1971	Aushändigung des Diploms
1. 6. 1971	Anstellung als Wissenschaftlicher Angestellter an der Kohlenstoffbiologischen Forschungsstation Dortmund (seit 1. 1. 1974 Abteilung Algenforschung der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH, München)
15. 10. 1974	Anstellung als Verwalter der Dienstgeschäfte eines Wissenschaftlichen Assistenten am Lehrstuhl für Botanik der TU München in Weihenstephan

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. C. J. Soeder an der Kohlenstoffbiologischen Forschungsstation Dortmund ausgeführt.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren Anders, Bückmann, von Denffer, Ewald, Gosselck, Hoppe, Knapp, Schraudolf, Schwantes, Soeder, Frau Steubing, Weberling, Winkler.